

# **Enzymatische Ligation von Peptiden, Peptidnucleinsäuren und Proteinen**

## **DISSERTATION**

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Chemie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Dipl.-Chem. Stephan Pritz

geb. am 03. 12. 1976

in Berlin

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Dr. h. c. Christoph Marksches

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Dr. Christian Limberg

Gutachter: 1. Prof. Dr. Michael Bienert

2. Prof. Dr. Oliver Seitz

Tag der mündlichen Prüfung: 23.05.2008

## **Zusammenfassung**

Peptide und Proteine sind wichtige Untersuchungsobjekte der biochemischen Forschung. Es wurden in den letzten Jahren eine Reihe von Ligationsmethoden entwickelt, um weitgehend entschützte, gereinigte Peptidsequenzen im wässrigen Milieu zu koppeln. Vor diesem Hintergrund von besonderem Interesse für einen möglichen Einsatz bei Ligationen ist die bakterielle Transpeptidase Sortase A. Dieses Enzym ist in vivo an der Anknüpfung von Proteinen an das bakterielle Peptidoglycan beteiligt, wobei es Substrate an einem LPXTG-Motiv zwischen Threonin und Glycin spaltet und auf ein Oligoglycin-Nucleophil überträgt.

Zur Untersuchung der Enzymaktivität wurde in dieser Arbeit ein einfacher HPLC-basierter Assay etabliert.

Die an Peptidmodellen gewonnenen Resultate wurden schließlich für den Aufbau eines löslichen Rezeptors genutzt. Ein Schlüsselschritt war die Sortase-vermittelte Ligation des in *E. coli* exprimierten, gefalteten Rezeptor-N-Terminus an ein 3-Loop-Konstrukt. Das erhaltene 23 kDa große Rezeptormimetikum war nach chromatographischer Reinigung homogen gemäß HPLC und MS. Es zeigte eine spezifische, hoch affine Bindung zu natürlichen Peptidliganden des CRF1-Rezeptors.

Weiterhin konnte demonstriert werden, dass sich Sortase für die selektive Markierung von Proteinen eignet. So wurde ein Fluoreszenzlabel C-terminal an das 50 kDa Protein NEMO geknüpft.

Als weiteres Anwendungsbeispiel der Sortase-vermittelten Ligation diene die Darstellung von PNA–CPP-Konjugaten. Die Verwendung von Überschüssen des Peptides und die Entfernung der niedermolekularen Abgangsgruppe durch Dialyse erwies sich als sehr effektiv und gestattete gute bis hervorragende Kupplungsausbeuten von bis zu 94%. Die biologische Wirkung der erhaltenen CPP–PNA-Konjugate konnte in Aufnahmeuntersuchungen an Zellen gezeigt werden.

Schlagwörter:

enzymatische Ligation, Proteinchemosynthese, Sortase, Peptidnucleinsäure

## **Abstract**

Peptides and proteins are important research objects in biochemical research. Therefore, several ligation methods to couple unprotected, purified peptide sequences in aqueous media have been developed during the last years. At a special interest in this case is the bacterial transpeptidase sortase A. This enzyme couples proteins in vivo to the bacterial peptidoglycan by cleavage at a LPXTG-recognition motif between threonine and glycine and subsequent transfer to an oligoglycin nucleophile.

In order to investigate the enzymatic activity, a simple HPLC-based assay was established in this work.

Results obtained with model peptides were used for the assembly of a soluble receptor. A key step was the sortase-mediated ligation of the folded receptor N-terminus (expressed in *E. coli*) to the 3-loop-construct. The resulting receptor mimic of 23 kDa was homogeneous according to HPLC and MS. It showed specific binding to natural peptide ligands of the CRF1-receptor with high affinity.

Furthermore, it could be shown that sortase is usable for selective protein labeling. For this purpose, a fluorescence label was attached C-terminally to the 50 kDa protein NEMO.

As a further example of sortase-mediated ligation served the synthesis of PNA-CPP-conjugates. The use of an excess of the peptide and dialyzing away the small leaving group proved to be very effective and coupling yields up to 94% could be achieved. The biological activity of the CPP-PNA-conjugates could be shown by uptake studies in cells.

Keywords:

enzymatic ligation, protein chemosynthesis, sortase, peptide nucleic acid

*Stets findet Überraschung statt  
da, wo man's nicht erwartet hat.*

*Wilhelm Busch*

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1. Überblick über Verfahren zur Peptid- und Proteinligation.....	1
1.2. Enzymatische Ligationsverfahren .....	8
1.3. Die Transpeptidase Sortase .....	12
1.4. Zielstellung.....	15
<b>2. Ergebnisse und Diskussion .....</b>	<b>16</b>
2.1. Expression und Reinigung von Sortase .....	16
2.2. Optimierung der Sortase-vermittelten Ligation .....	17
2.2.1. Charakterisierung der Erkennungssequenz.....	17
2.2.2. Vergleich verschiedener Nucleophile und Abgangsgruppen .....	22
2.2.3. Bestimmung der Aktivität des Enzyms in Gegenwart von Co-Solvenzien .....	24
2.3. Synthese von Konjugaten aus Peptidnucleinsäuren und zellpenetrierenden Peptiden.....	26
2.3.1. Einleitung .....	26
2.3.2. Synthese der PNA-Oligomere.....	27
2.3.3. Synthese der Konjugate.....	34
2.4. Synthese eines künstlichen Rezeptor-Konstrukts .....	39
2.4.1. Einleitung .....	39
2.4.2. Synthese des 3-Loop-Konstrukts.....	41
2.4.3. Expression und <i>in vitro</i> Faltung des Rezeptor-N-Terminus .....	43
2.4.4. Sortase-vermittelte Ligation von N-Terminus und 3-Loop-Konstrukt.....	45
2.4.5. Bindungsuntersuchungen am Rezeptor-Konstrukt .....	47
2.5. C-terminale Fluoreszenzmarkierung von Proteinen .....	50
2.6. Untersuchungen von Sortase-Inhibitoren .....	54
2.7. Zusammenfassung und Ausblick.....	56
<b>3. Experimenteller Teil .....</b>	<b>59</b>
3.1. Allgemeines.....	59
3.1.1. Allgemeine Arbeitstechniken .....	59
3.1.2. Lösungsmittel.....	59
3.1.3. UV-Spektrometer .....	59

3.1.4. Chromatographische Methoden .....	59
3.1.5. Massenspektrometer .....	60
3.1.6. LC-MS .....	60
3.2. Experimente .....	61
3.2.1. Ausgangsstoffe .....	61
3.2.2. Allgemeine Vorschrift zur manuellen Synthese von Peptiden .....	62
3.2.3. Automatisierte Peptidsynthese .....	62
3.2.4. Isolierung der genomischen DNA aus <i>S. aureus</i> .....	63
3.2.5. Expression und Reinigung von Sortase A .....	63
3.2.6. SDS-PAGE .....	64
3.2.7. Synthese und Analytik der Peptidbibliotheken für die Optimierung der Sortase-Erkennungssequenz .....	65
3.2.8. Allgemeine Vorschrift für die Sortase-vermittelte Ligation der beiden Bibliotheken .....	67
3.2.9. Bestimmung des Umsatzes für die Sortase-vermittelte Ligation mittels HPLC in Abhängigkeit von der Zeit .....	67
3.2.10. Bestimmung des Umsatzes der Sortase-vermittelten Ligation von Dns-LPKTGGGX <sup>3</sup> X <sup>3</sup> -NH <sub>2</sub> mit H-GGGX <sup>4</sup> X <sup>4</sup> -NH <sub>2</sub> .....	68
3.2.11. Datenbanksuche nach potentiellen, proteinogenen Substraten für Sortase A .....	68
3.2.12. Synthese und Analytik der unnatürlichen Substrate und Nucleophile .....	68
3.2.13. Bestimmung des Umsatzes der Sortase-vermittelten Ligation mit anderen Nucleophilen und Abgangsgruppen .....	69
3.2.14. Bestimmung der enzymatischen Aktivität in verschiedenen Lösungsmitteln .....	69
3.2.15. Manuelle Synthese von PNAs mit HATU oder PyBOP .....	69
3.2.16. Synthese der PNA-Modellfragmente <b>14</b> und <b>15</b> .....	70
3.2.17. Synthese der zellpenetrierenden Peptide <b>18-26</b> .....	70
3.2.18. Synthese der PNAs <b>27-31</b> .....	71
3.2.19. Synthese der CPP-PNA-Konjugate mittels Sortase-vermittelter Ligation .....	71
3.2.20. Synthese des Peptidtemplats <b>47</b> .....	72
3.2.21. Synthese des 1-Loop-Konstrukts <b>48</b> .....	72
3.2.22. Kupplung von Maleimidohexansäure an <b>48</b> .....	73
3.2.23. Synthese des 2-Loop-Konstrukts <b>49</b> .....	73

---

3.2.24. Hydrazinabspaltung vom 2-Loop-Konstrukt <b>49</b> .....	73
3.2.25. Kupplung von Maleimidohexansäure an das 2-Loop-Konstrukt.....	73
3.2.26. Synthese des 3-Loop-Konstrukts <b>50</b> .....	74
3.2.27. Synthese des 3-Loop-Konstrukts <b>51</b> (Abspaltung der Z-Schutz- gruppe) .....	74
3.2.28. Expression und <i>in vitro</i> Rückfaltung des CRF <sub>1</sub> -Rezeptor-N-Terminus .....	74
3.2.29. Enzymatischer Verdau des CRF <sub>1</sub> -Rezeptor-N-Terminus zur Bestimmung des Disulfidmusters.....	75
3.2.30. Sortase-vermittelte Ligation von ECD1-LPKTGGRR und dem 3- Loop-Konstrukt <b>51</b> .....	75
3.2.31. Synthese von H-Gly-Gly-Gly-Lys(Dns)-NH <sub>2</sub> ( <b>52</b> ) .....	75
3.2.32. Fluoreszenzmarkierung von ECD1-LPKTGGRR .....	76
3.2.33. Enzymatischer Verdau von NEMO mittels Trypsin.....	76
3.2.34. C-terminale Dansylierung von NEMO mittels Sortase-vermittelter Ligation .....	79
3.2.35. Bestimmung der enzymatischen Aktivität in Gegenwart von Peptidylketoaldehyd-Inhibitoren.....	79
<b>4. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>80</b>
<b>5. Anhang.....</b>	<b>90</b>

## Danksagungen

Besonderer Dank gilt meinen Betreuern Prof. Michael Bienert und Dr. Michael Beyermann für die interessante Thematik, ihr reges Interesse am Fortgang der Arbeiten und ihre ständige Gesprächsbereitschaft.

Ferner sei folgenden Personen für ihre Unterstützung beim Zustandekommen dieser Arbeit gedankt:

- Meiner Laborkollegin Yvonne Wolf – nun Dr. Yvonne Turner – und Dr. Johannes Oehlke für die Testung der Konjugate und viele interessante Diskussionen,
- Dr. Oliver Krätke und Dr. Jana Klose für die Einführung in die Biotechnologie und die Expression und Reinigung von NEMO, Dr. Juana de Diego (MPI für Infektionsbiologie) für die Staphylokokken-Übernachtskultur,
- Anne Klose für die Einführung in die praktischen Aspekte der Peptidsynthese und für die Synthese und Reinigung der cyclischen extrazellulären Rezeptordomänen, Dr. Klaus Fechner und Gabi Vogelreiter für die Bindungsuntersuchungen am Rezeptorkonstrukt,
- meinen Forschungspraktikanten Verena Veneruso und Steffen Ramin für die gute Zusammenarbeit,
- Dr. Eberhard Krause und seiner AG Massenspektrometrie, namentlich Dr. Michael Schümann, Dr. Clementine Klemm, Heidi Lerch und Heike Stephanowitz, für viele gemessene MALDI-Spektren und wertvolle Diskussionen, Adeeb El-Dahshan und Prof. Jörg Rademann für die gute Zusammenarbeit,
- Heike Nikolenko und Marianne Dreissigacker für die hervorragende Unterstützung bei allen organisatorischen Belangen, meinen Kollegen aus der Abteilung Peptidchemie, besonders Dagmar Krause, Bernhard Schmikale, Bärbel Pizarz, Angelika Ehrlich, Dr. Margitta Dathe und meinen Mitdoktoranden Dr. Sandra Tremmel, Christian Hoppmann, Benoît Briand, Irene Coin, Dr. Sandro Keller, Eik Leupold, Dr. Axel Wessolowski und Christof Junkes für die nette Arbeitsatmosphäre und die vielen hilfreichen Diskussionen,
- Antje Neubauer und Mario Elbin für das Korrekturlesen dieser Arbeit,
- für finanzielle Unterstützung der Europäischen Kommission (QLK3-CT-2002-01989), der GDCh (Reisestipendium zum 29. Europäischen Peptidsymposium 2006 in Gdansk) und der American Peptide Society (Reisestipendium zum 20. Amerikanischen Peptidsymposium 2007 in Montreal).



## Abkürzungsverzeichnis

Sofern nicht anders angegeben, bezeichnen die Symbole der chiralen Aminosäuren das L-Isomer. Abkürzungen wurden entsprechend den Empfehlungen der IUPAC-IUB Kommission der Biochemischen Nomenklatur<sup>[1]</sup> verwendet. Zusätzlich wurden folgende Abkürzungen benutzt:

a	Adenin (PNA Basenbaustein)
Ac	Acetyl
ACN	Acetonitril
Ahx	$\epsilon$ -Aminohexansäure
APS	Ammoniumpersulfat
Äq.	Äquivalent
ber.	berechnet
Bhoc	Benzhydryloxycarbonyl (Schutzgruppe)
c	Cytosin (PNA Basenbaustein)
CD	Circulardichroismus
cpm	Radioaktive Zerfälle pro Minute ( <i>counts per minute</i> )
CPP	zellpenetrierendes Peptid ( <i>cell penetrating peptide</i> )
CRF	Corticotropin-Releasing Factor
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid (Hexadecyltrimethylammoniumbromid)
Da	Dalton
DCM	Dichlormethan
Dde	(4,4-Dimethyl-2,6-dioxocyclohexyliden)ethyl (Schutzgruppe)
DIC	Diisopropylcarbodiimid
DIPEA	Diisopropylethylamin (Hünig-Base)
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure ( <i>desoxyribonucleic acid</i> )
Dns	Dansyl
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECD	extrazelluläre Domäne ( <i>extracellular domain</i> )
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EEL	Exprimierte enzymatische Ligation
Egl, o	Ethylenglykollinker, [2-(2-Aminoethoxy)ethoxy]essigsäure
EPL	Ligation exprimierter Proteine ( <i>expressed protein ligation</i> )

---

ESI	Elektrospray-Ionisation
FAM	5-Carboxyfluorescein
Fmoc	9-Fluorenylmethyloxycarbonyl (Schutzgruppe)
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer ( <i>fluorescence resonance energy transfer</i> )
g	Guanin (PNA Basenbaustein)
gef.	gefunden
GFP	grün fluoreszierendes Protein ( <i>green fluorescent protein</i> )
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor ( <i>G protein-coupled receptor</i> )
GuHCl	Guanidinhydrochlorid
HATU	<i>N</i> -[(Dimethylamino)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazolo[4,5- <i>b</i> ]pyridin-1-ylmethyl]- <i>N</i> -methylmethanaminiumhexafluorophosphat- <i>N</i> -oxid
HBTU	<i>N</i> -[(1 <i>H</i> -Benzotriazol-1-yl)-(dimethylamino)methyl]- <i>N</i> -methylmethanaminiumhexafluorophosphat- <i>N</i> -oxid
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie ( <i>high performance liquid chromatography</i> )
IC <sub>50</sub>	mittlere inhibitorische Konzentration
ICD	intrazelluläre Domäne ( <i>intracellular domain</i> )
IKK	IκB Kinasekomplex
IMAC	Affinitätschromatographie an immobilisierten Metallionen ( <i>immobilized metal-ion affinity chromatography</i> )
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
LB-Medium	<i>lysogeny broth</i> (komplexes Nährmedium zur Kultivierung von Bakterien, auch Luria-Bertani-Medium genannt)
LC-MS	Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie-Kopplung ( <i>liquid chromatography-mass spectrometry</i> )
Lit.	Literaturzitat
MALDI	Matrix-unterstützte Laserdesorptionsionisation ( <i>matrix-assisted laser desorption ionisation</i> )
Mhx-OSu	Maleimidohexansäure- <i>N</i> -hydroxysuccinimidester
Mmt	4-Methoxytrityl (Schutzgruppe)
mRNA	Boten-RNA ( <i>messenger-RNA</i> )
MS	Massenspektrometrie

---

MWCO	<i>molecular weight cut off</i> (Definition der Trennschärfe bei Membranverfahren anhand der molaren Masse einer Substanz)
NCL	Native chemische Ligation
NEMO	NF- $\kappa$ B <i>essential modulator</i>
NF- $\kappa$ B	<i>nuclear factor</i> -kappa B
NMP	1-Methylpyrrolidin-2-on
o	Einbuchstabencode für Egl (siehe auch Egl)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PEG	Polyethylenglykol
Pfp	Pentafluorophenyl
PNA	Peptidnucleinsäure ( <i>peptide nucleic acid</i> )
PyAOP	7-Azabenzotriazol-1-yloxy-tris-(pyrrolidino)phosphoniumhexafluorophosphat
PyBOP	Benzotriazol-1-yloxy-tris-(pyrrolidino)phosphoniumhexafluorophosphat
PyBroP	Bromo-tris-(pyrrolidino)phosphoniumhexafluorophosphat
Rel. Int.	relative Intensität
RNA	Ribonucleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
RP-HPLC	Umkehrphasen HPLC ( <i>reversed phase HPLC</i> )
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>revolutions per minute</i> )
RT	Raumtemperatur
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>sodium dodecylsulphate</i> )
SDS-PAGE	SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese
SPA	Szintillations-Nachbarschafts-Assay ( <i>scintillation proximity assay</i> )
SPPS	Festphasenpeptidsynthese ( <i>solid-phase peptide synthesis</i> )
SrtA	Sortase A
t	Thymin (PNA Basenbaustein)
TASP	Templat-assoziierte synthetische Proteine ( <i>template-assembled synthetic proteins</i> )
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TFE	Trifluorethanol
TFMSA	Trifluormethansulfonsäure

---

TIPS	Triisopropylsilan
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tris-HCl	Tris(hydroxymethyl)aminomethan-hydrochlorid
tRNA	Transfer-RNA
UV	ultraviolett
Xaa	beliebige Aminosäure
Yaa	beliebige Aminosäure
Z	Benzyloxycarbonyl (Schutzgruppe)
Z	<i>pyro</i> -Glutamin

## 1. Einleitung

### 1.1. Überblick über Verfahren zur Peptid- und Proteinligation

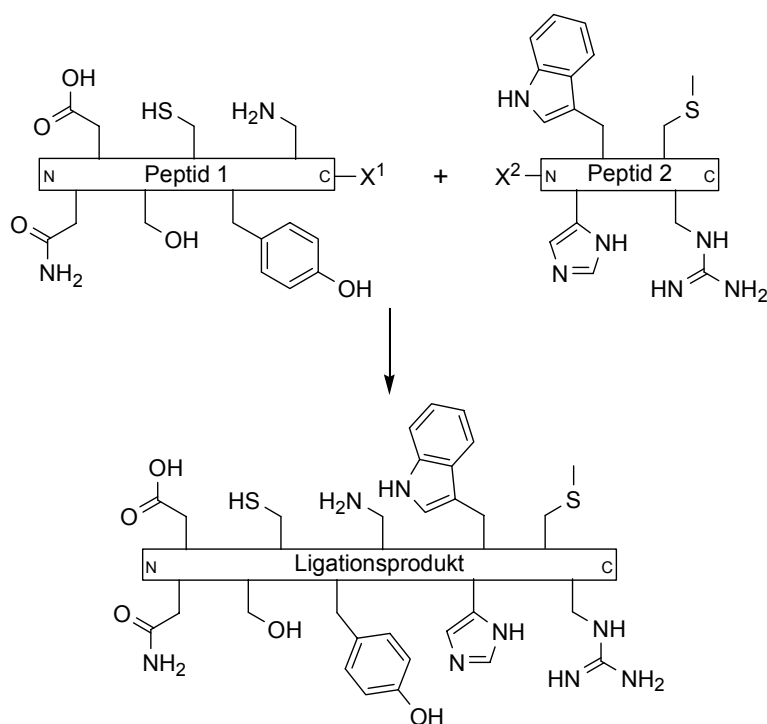
Proteine und Peptide sind aus Aminosäuren aufgebaute Biopolymere und an vielen chemischen und physikalischen Prozessen, die das Leben biologischer Organismen ausmachen, beteiligt. Sie sind unter anderem verantwortlich für die Katalyse chemischer Reaktionen in der Zelle, Stofftransport, Strukturbildung, Bewegung und regulatorische Aufgaben, wie Überwachung der intrazellulären und extrazellulären Bedingungen und Weitergabe von Informationen an andere zelluläre Bestandteile. Zum Verständnis dieser Vorgänge auf molekularer Ebene werden natürlich vorkommende und modifizierte Proteine untersucht.

Größere Proteine können durch rekombinante Expression in biologischen Systemen erhalten werden. Hierbei ist man in der Regel jedoch auf den Satz proteinogener Aminosäuren beschränkt, die aber durch ortsgerichtete Mutagenesen beliebig ausgetauscht werden können. Mit chemischen Methoden sind Proteine aufgrund ihrer Vielzahl von funktionellen Gruppen nur schwierig selektiv modifizierbar. Eine Möglichkeit zur Einführung unnatürlicher Reste ist die Beladung von tRNAs mit der modifizierten Aminosäure, die dann von der Translationsmaschinerie an bestimmten Codons in das Protein eingefügt wird.<sup>[2]</sup> Obwohl diese Methode ein wertvolles Werkzeug zur Produktion artifiziereller Proteine werden könnte, ist dafür noch einige Entwicklungsarbeit vonnöten. So sind die Ausbeuten gering, die technischen Methoden recht aufwändig und viele unnatürliche Aminosäuren inkompatibel mit der ribosomalen Synthese.

Die von Merrifield initiierte Festphasenpeptidsynthese (SPPS)<sup>[3]</sup> hat durch Weiterentwicklungen auf den Gebieten der Schutzgruppen, der Kupplungsreagenzien und verbesserter Harzeigenschaften einen hohen Stand erreicht.<sup>[4]</sup> Für die Praxis besteht allerdings eine Begrenzung hinsichtlich der Größe der Peptide auf etwa 60 Aminosäuren. Dies wird dadurch bedingt, dass sich Nebenprodukte im Verlauf der Synthese akkumulieren, was letztendlich zu nicht trennbaren Produktgemischen führt.<sup>[5]</sup> Längere Peptide bzw. kleine Proteine können durch Segmentkondensation kleinerer, vollgeschützter Segmente erhalten werden,<sup>[6]</sup> obwohl man hierbei mit Problemen wie der Schwerlöslichkeit geschützter Segmente in organischen Lösungsmitteln und der partiellen Epimerisierung der aktivierten C-terminalen Aminosäure rechnen muss. Trotzdem gibt es beeindruckende Beispiele für die Anwendung dieser Methode. Das

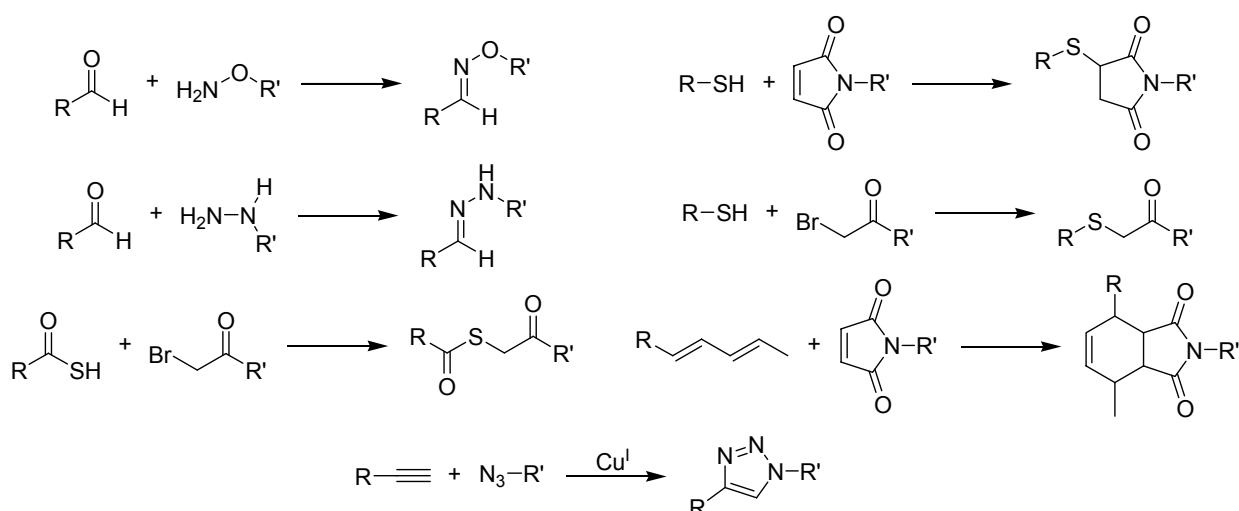
bemerkenswerteste ist die Synthese von grün fluoreszierendem Protein (GFP, 238 Aminosäuren) aus 26 Segmenten von Sakakibara *et al.*<sup>[7]</sup> Neben der chemischen Synthese von Proteinen besteht ein großes Interesse an deren gezielter Markierung. Im Rahmen der Chemosynthese wird die Möglichkeit zur Modifizierung der Peptide mit artifiziellen Gruppen nahezu nur durch die Fantasie und das experimentelle Geschick des Synthetikers eingeschränkt.

Durch die Anwendung von Ligationsverfahren können rekombinante und chemisch synthetisierte Segmente miteinander verknüpft werden. Dies führt zu einer wesentlichen Erweiterung sowohl der Möglichkeiten zur Synthese von Proteinen, als auch zur gezielten Einführung von funktionellen Gruppen. Mittels Ligation konnten photoaktivierbare *Cross-linker*, Fluorophore, Kohlenhydrate, Lipide, unnatürliche oder phosphorylierte Aminosäuren, stabile Isotope und andere biochemische oder biophysikalische Sonden ortsspezifisch in rekombinant exprimierte Proteine eingeführt werden.<sup>[8]</sup> Unter Peptid- oder Proteinligation versteht man die selektive Verknüpfung zweier (zuvor chromatographisch gereinigter) Peptide mit (weitgehend) ungeschützten Seitenketten unter milden Bedingungen in wässrigen Puffersystemen. Die Abwesenheit von Schutzgruppen dient der Erhöhung der Löslichkeit der Reaktanden in Wasser. Darüber hinaus bestünde bei nachfolgendem Entschützen immer das Risiko der Bildung von Nebenprodukten, die meist nur schwer chromatographisch abtrennbar sind. Da bei Ligationen ungeschützter Segmente zahlreiche funktionelle Gruppen reagieren könnten, müssen bei Anwendung dieser Methoden der C-Terminus eines Peptids oder Proteins mit dem N-Terminus eines anderen Peptids oder Proteins sowohl chemo- als auch regioselektiv unter Ausbildung einer kovalenten Bindung reagieren (Schema 1).



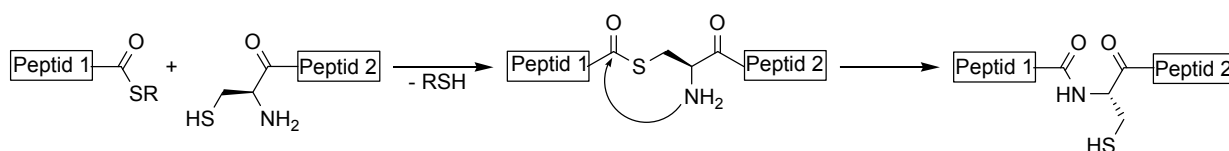
**Schema 1.** Prinzip der Peptidligation: Der C-Terminus von Peptid 1 reagiert chemo- und regioselektiv mit dem N-Terminus von Peptid 2 unter Ausbildung einer kovalenten Bindung.

Es werden hierfür sowohl Methoden verwandt, die zur Bildung einer nativen Peptidbindung (= Amidbindung) führen,<sup>[9]</sup> als auch solche, die andere Bindungstypen erzeugen. Zu letzteren gehören die Bildung von Oximen aus Aldehyden und Aminoxygruppen,<sup>[10]</sup> von Hydrazonen aus Aldehyden und Hydrazinderivaten,<sup>[11]</sup> von Thioestern aus Thiocarbonsäuren und  $\alpha$ -Bromocarbonylverbindungen,<sup>[12]</sup> von Thioethern aus Thiolen und Maleimiden<sup>[13]</sup> oder Bromessigsäurederivaten<sup>[14]</sup> sowie Cycloadditionen wie die Diels-Alder-Reaktion<sup>[15]</sup> oder die kupferkatalysierte Variante der 1,3-dipolaren Cycloaddition von Aziden mit terminalen Alkinen (*click chemistry*)<sup>[16]</sup> (Schema 2).



**Schema 2.** Chemische Methoden der Peptidligation, die zu nicht-Peptidbindungen führen (siehe Text).

Die Konformationen der gebildeten Proteine können jedoch gegenüber ihren natürlichen Vorbildern durch Störung der Backbonestruktur in nicht gewünschter Weise verändert sein. Außerdem sind einige der genannten Bindungen unter biologisch relevanten Bedingungen labil oder die benötigten funktionellen Gruppen sind nur schwierig selektiv in rekombinant exprimierte Proteine einzuführen. Deshalb werden häufig die Ligationen eingesetzt, die zu nativen Peptidbindungen führen. Von den Methoden, die für diesen Zweck entwickelt wurden, ist die native chemische Ligation (NCL) die gebräuchlichste.<sup>[8,17]</sup> Dieser Ansatz basiert auf der Reaktion eines synthetischen C-terminalen Peptidthioesters mit einem N-terminalen Cystein (Schema 3). So wurde beispielsweise die Synthese eines polymermodifizierten Erythropoietins (EPO) aus 166 Aminosäuren mittels NCL aus vier ungeschützten Peptidsegmenten erreicht.<sup>[18]</sup>

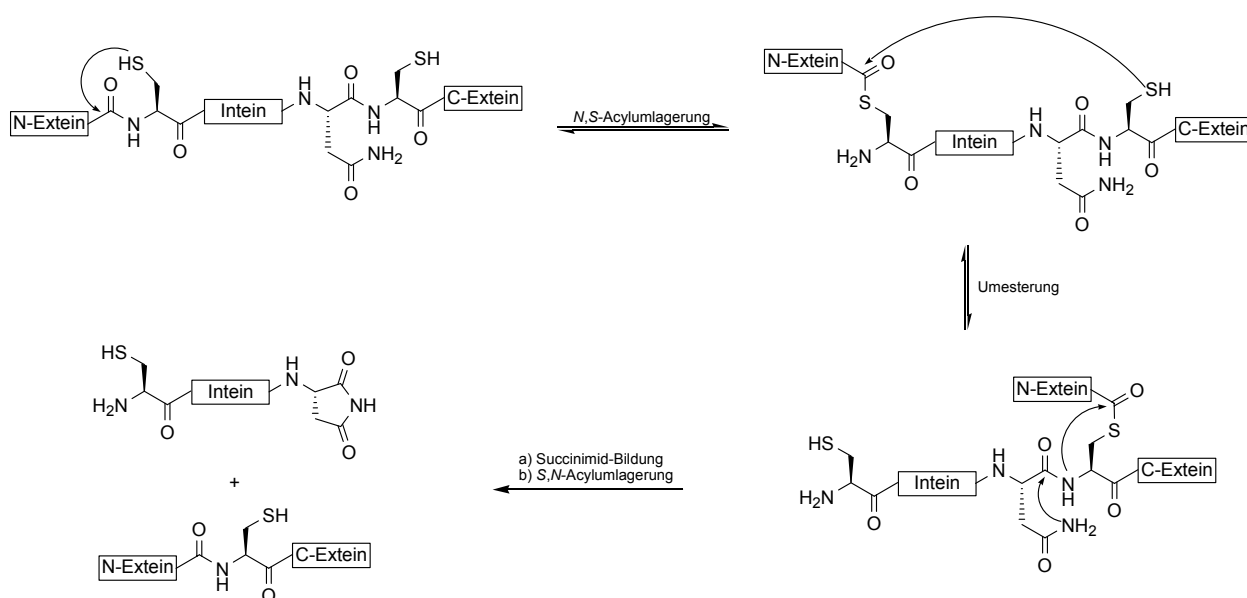


**Schema 3.** Mechanismus der nativen chemischen Ligation (NCL).

Die Beschränkung auf Substrate mit N-terminalem Cystein kann durch die Verwendung von abspaltbaren Hilfsgruppen, die die Thiofunktion tragen, umgangen werden.<sup>[19]</sup> Diese Thiohilfsgruppen haben bisher jedoch keine breite Anwendung gefunden.<sup>[20]</sup> Eine weitere Voraussetzung für NCL ist eine effiziente Synthese des Peptidthioesters, was Schwierigkeiten bei größeren Segmenten aufwerfen kann. Deshalb wurde eine



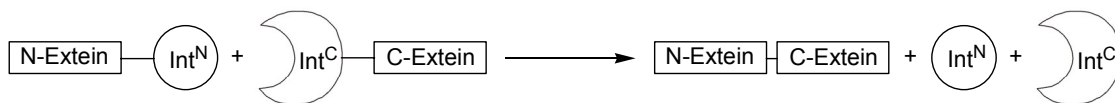
Erweiterung der NCL entwickelt, bei der der C-terminale Thiolester des gewünschten Proteins von einem rekombinant exprimierten Intein-Fusionsprotein gewonnen wird. Diese Methode heißt Ligation exprimierter Proteine (*expressed protein ligation*, EPL).<sup>[21]</sup> Inteine sind in der Natur vorkommende Proteindomänen, die sich selbst aus einer Polypeptidkette herausschneiden können und gleichzeitig die flankierenden Bereiche, die Exteine, über eine Peptidbindung verknüpfen. Diese Reaktion, die auch als Proteinspleißen bezeichnet wird, verläuft über eine *N,S*-Acylumlagerung des N-terminal flankierenden Polypeptids und eine Umesterung des dadurch gebildeten Thiolesters. Die Cyclisierung eines Asparaginrestes zum Succinimid führt zur Abspaltung des Inteins und zur Verknüpfung der beiden Exteine (Schema 4).



**Schema 4.** Mechanismus des Proteinspleißens. Die Reaktion verläuft über eine Serie von Acylumlagerungen und intramolekularen Reaktionen, die durch die zentrale Inteinproteindomäne katalysiert werden. Der Prozess resultiert in der Verknüpfung der zwei flankierenden Polypeptide, der N- und C-Exteine, über eine Peptidbindung.

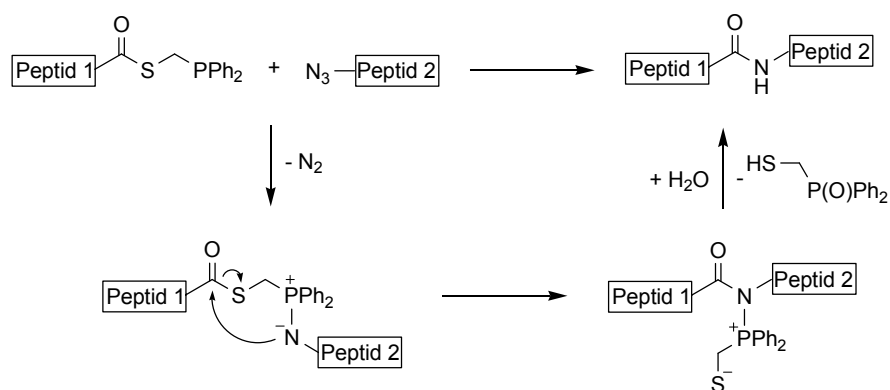
Das für die EPL verwendete Intein wurde mit molekularbiologischen Methoden verändert, so dass die Spleißreaktion auf der Stufe des Proteinthiolesters mit der Sulfhydrylgruppe des N-terminalen Cysteins des Inteins stehen bleibt. Durch Umsetzung mit einem Überschuss an Thiol wird der gewünschte Proteinthiolester vom Intein abgespalten und kann analog der NCL mit einem Peptid oder Protein mit N-terminalem Cystein verknüpft werden. EPL wurde erfolgreich zum Aufbau von modifizierten Proteinen angewendet.<sup>[22]</sup>

Ein neues biochemisches System der Proteinligation beruht auf dem *trans*-Proteinspleißen.<sup>[23]</sup> Hierbei werden Inteine verwendet, die in ein N-terminales ( $\text{Int}^{\text{N}}$ ) und ein C-terminales Fragment ( $\text{Int}^{\text{C}}$ ) geteilt sind. Diese zwei Fragmente können zu einem aktiven Komplex assoziieren und die Spleißreaktion katalysieren. Abhängig von der Position an der das Intein geteilt wurde, können die  $\text{Int}^{\text{N}}$  und  $\text{Int}^{\text{C}}$  Fragmente relativ klein und somit synthetisch zugänglich sein. So konnte beispielsweise ein synthetisches N-Extein- $\text{Int}^{\text{N}}$ -Peptid mit einem rekombinanten  $\text{Int}^{\text{C}}$ -C-Exteinprotein zur Spleißreaktion gebracht werden, wodurch die beiden Exteine gekuppelt wurden (Schema 5).<sup>[24]</sup>



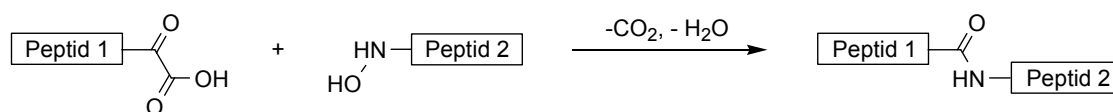
**Schema 5.** Prinzip des *trans*-Proteinspleißens ( $\text{Int}^{\text{N}}$ ,  $\text{Int}^{\text{C}}$ : N- und C-terminale Inteindomäne).

Bei einer weiteren chemischen Methode, der Staudinger Ligation, reagiert ein C-terminaler Phosphinothiolester mit einem Peptid, das ein N-terminales Azid besitzt (Schema 6).<sup>[25]</sup> Die Reaktion verläuft über ein Iminophosphoran, welches zu einem Amidophosphoniumsalz umlagert. Dieses wird hydrolysiert, wodurch das gewünschte Amid und ein Phosphinoxid entstehen. Ein Vorteil der Staudinger Ligation besteht darin, dass kein N-terminales Cystein am C-terminalen Fragment notwendig ist. Im Prinzip ist jede Kombination von Aminosäuren Xaa-Yaa an der Ligationsstelle möglich, jedoch scheint es, dass Glycin an der Position Yaa stark bevorzugt ist, da die sterische Hinderung dann minimal ist.<sup>[26]</sup>



**Schema 6.** Mechanismus der Staudinger Ligation.

Eine neue Methode beruht auf der decarboxylierenden Ligation zwischen einer  $\alpha$ -Ketocarbonsäure und einem *N*-Alkylhydroxylamin (Schema 7).<sup>[27]</sup> Die Synthese eines Proteins nach diesem Verfahren steht jedoch noch aus.



**Schema 7.** Decarboxylierende Ligation nach Bode *et al.*<sup>[27]</sup>

Eine weitere wichtige Anwendung der chemischen Ligation liegt – neben der Totalsynthese und Modifizierung von Proteinen – im Protein-*de novo*-Design. Darunter ist der Entwurf einer Polypeptidsequenz zu verstehen, die unter geeigneten Bedingungen eine vorgegebene, funktionsfähige Tertiärstruktur ausbilden kann. Zur Realisierung einer gewünschten Proteintopologie hat Manfred Mutter das TASP-Konzept (Templat-assoziierte synthetische Proteine) vorgeschlagen.<sup>[28]</sup> Dabei werden mehrere Peptiddomänen kovalent auf einem Trägermolekül (Templat) fixiert. Dem Templat kommt die Funktion zu, die Peptidketten zu einer ähnlichen Packungsanordnung wie in Proteinen zu dirigieren. Die Anknüpfung selbst erfolgt mittels SPPS, Segmentkondensation oder Ligationmethoden, da die erhaltenen Konstrukte eine unnatürliche, verzweigte Struktur aufweisen und somit nicht durch biologische Methoden zugänglich sind. Auf diesem Konzept aufbauend konnten verschiedene helikale Proteinstrukturen, u. a. parallele und antiparallele vier-Helixbündel und  $\beta\beta\alpha$ -Motive, synthetisiert werden.<sup>[29]</sup> Haehnel *et al.* entwickelten Häm-enhaltene vier-Helixbündel, die auf einem cyclischen Templat fixiert waren. Diese Konstrukte zeigten Eigenschaften von Redoxproteinen.<sup>[30]</sup> Peptidtemplate wurden ebenfalls zur Konstruktion künstlicher Membranproteine verwendet. So knüpften Montal *et al.* vier identische Peptide an ein lineares Templat. Das erhaltene Konstrukt war in der Lage einen Kanal in Lipidmembranen zu bilden.<sup>[31]</sup>

Die etabliertesten der oben erwähnten Ligationmethoden – NCL und EPL – verwenden ebenso wie die Staudinger-Ligation einen Überschuss an Thiol für die Bildung der Thiolester, oder Thiole werden während der Kupplung freigesetzt. Das heißt, sie sind nicht ohne weiteres auf die Verknüpfung redox-sensitiver Substrate, z. B. Disulfidbrücken enthaltende Proteine, anwendbar. Außerdem sind bestimmte Fluorophore (z. B. BODIPY) unter den Bedingungen der EPL instabil.<sup>[15a]</sup> Darüber

hinaus ist es natürlich vorteilhaft, das Repertoire an Methoden zur Peptid- und Proteinligation zu erweitern.

## 1.2. Enzymatische Ligationsverfahren

Enzyme sind Proteine, die eine spezifische chemische Reaktion katalysieren, was sie zu wertvollen Werkzeugen in der organischen Synthesechemie macht. Sie besitzen eine hohe inhärente Substratspezifität, weshalb enzymatische Peptid- oder Proteinligationen sogar noch selektiver sein können als ihre chemischen Pendanten. Diese Spezifität ist auch der Grund dafür, dass ein universelles Enzym, das alle proteinogenen Aminosäuren miteinander koppeln könnte, bisher weder entwickelt wurde, noch aus der Natur bekannt ist.<sup>[32]</sup> Jedoch existieren einige Enzyme für die gegenteilige Reaktion: Proteasen, die Proteine oder Peptide spezifisch an bestimmten Resten hydrolysieren können. Gemäß van't Hoff's Prinzip der mikroskopischen Reversibilität wird die Rückreaktion, die gewünschte Ligation, ebenso katalysiert. Da die Hydrolyse einer Peptidbindung aber exergon ist, muss man die Reaktionsbedingungen in geeigneter Weise manipulieren, so dass die Gleichgewichtslage in Richtung Bildung der Peptidbindung verschoben wird.<sup>[32]</sup> Entsprechend gibt es heutzutage zahlreiche Beispiele für die Verwendung von Proteasen in der Protein- und Peptidsynthese.<sup>[33]</sup>

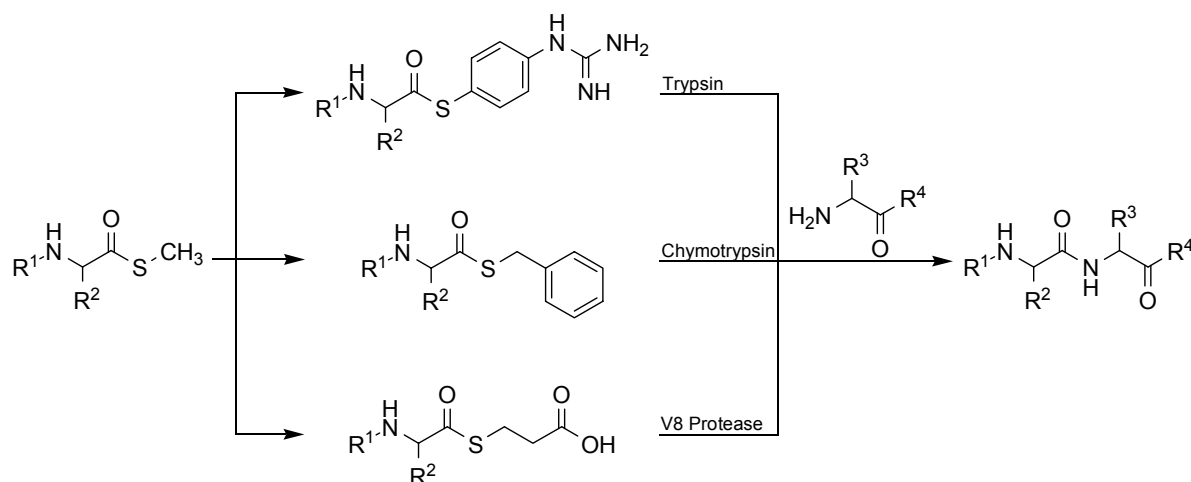
Es gibt zwei generelle Ansätze für die enzymatische Peptidsynthese: den thermodynamisch und den kinetisch kontrollierten. Der erste ist die Umkehrung der Hydrolysereaktion. Für ihn sind alle Arten von Proteasen geeignet. Im zweiten, welcher auf Serin- und Cysteinproteasen beschränkt ist, wird aus einem schwach aktivierten Acyldonor (R-COX) intermediär ein Acyl-Enzym gebildet, das durch Nucleophile angegriffen werden kann. Erfolgt der Angriff durch Wasser, führt das zur Hydrolyse, erfolgt er durch die  $\alpha$ -Aminogruppe einer Aminosäure, wird eine Peptidbindung gebildet. Die Reaktion muss bei der Maximalkonzentration an Produkt abgestoppt werden, da das entstandene Peptid ansonsten wieder enzymatisch gespalten würde (Schema 8). Zwei der Haupthindernisse bei der enzymatischen Synthese sind dementsprechend die Hydrolyse des Acyldonors und ungewünschte proteolytische Spaltungen innerhalb der Reaktanden oder Produkte durch das Enzym.



die der Spezifität des Enzyms entsprechen) erfolgreich als Acyldonoren eingesetzt.<sup>[35]</sup> Da der Rest an Position P<sub>1</sub>, der entscheidend für die Erkennung und Spaltung durch die Protease ist, im Produkt verbleibt, kann dieses jedoch in einer Folgereaktion wieder proteolytisch gespalten werden. Außerdem können der Ester oder das Acyl-Enzym hydrolysiert werden.

Bei Substrat-Mimetika ist die Seitenkette, die für die Erkennung durch das Enzym verantwortlich ist, vom C-terminalen Rest P<sub>1</sub> auf die Esterabgangsgruppe verschoben.<sup>[36]</sup> Der Acyldonor wird vom Enzym erkannt und das Acyl-Enzym unter Freisetzung der spezifitätstragenden Abgangsgruppe gebildet. Nach der Ligation kann das gebildete Peptid daher an dieser Position nicht mehr erkannt werden, und es tritt keine sekundäre proteolytische Spaltung auf.

Bordusa *et al.* konnten die Anwendung von Substrat-Mimetika durch die *in situ* Bildung von verschiedenen Thioestern aus einem gemeinsamen Methylthiolester-Vorläufer erweitern (Schema 9).<sup>[37]</sup> Dieser Ansatz könnte die Testung verschiedener Enzyme für die Ligation bestimmter Peptide vereinfachen.



**Schema 9.** *In situ* gebildete Substrat-Mimetika und nachfolgende enzymatische Ligation durch die entsprechende Protease.<sup>[37]</sup>

Durch exprimierte enzymatische Ligation (EEL), einer Kombination der Ligation exprimierter Proteine (EPL) und Protease-vermittelter Ligation, konnte das 70 Aminosäuren lange proNPY synthetisiert werden.<sup>[38]</sup> Der Thiolester des exprimierten N-terminalen Proteinfragments wurde mit V8 Protease und dem fluoreszenzmarkierten C-terminalen Peptid umgesetzt. Als eine Nebenreaktion trat hier Proteolyse auf.

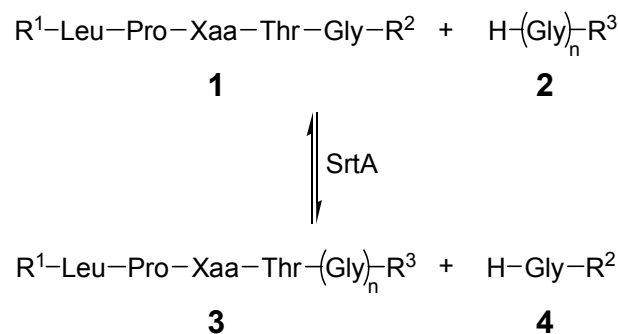
Das bisher am erfolgreichsten zur Ligation von Proteinen angewandte Enzym ist Subtiligase.<sup>[39,40]</sup> Dabei handelt es sich um eine Doppelmutante der Serinprotease Subtilisin BPN'. Durch die Mutation des katalytisch aktiven Ser<sup>221</sup> zu Cys ergab sich ein verbessertes Verhältnis von Aminolyse zu Hydrolyse für den Enzym-Substratkomplex. Der Austausch von Pro<sup>225</sup> durch Ala reduzierte die sterische Hinderung im aktiven Zentrum, die durch die erste Mutation verursacht worden war. Eine höhere katalytische Aktivität war die Folge.<sup>[41]</sup> Unter Verwendung dieses Enzyms konnte vollständig aktive RNase A (124 Reste) durch schrittweise Ligation von sechs veresterten Segmenten in Milligrammmengen synthetisiert werden. Obwohl die Ester partiell hydrolysiert wurden, konnte eine durchschnittliche Ausbeute von 70% pro Ligation erreicht werden. Außerdem konnten mit dieser Methode unnatürliche Aminosäuren in das Protein eingebaut werden.<sup>[39]</sup> Auch bei der N-terminalen Modifizierung von Met-hGH mit einem Peptid wurden hohe Ausbeuten erzielt.<sup>[40]</sup> Prinzipielle Nachteile dieser Methode sind die mögliche Proteolyse, weshalb unter kinetischer Kontrolle gearbeitet werden muss, und die Notwendigkeit der Synthese von Peptidestern.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass enzymatische Methoden zahlreiche Vorteile für Protein- und Peptidligationen bieten. Dazu gehören die Vermeidung von Racemisierung, keine Notwendigkeit des Schützens/Entschützens der Aminosäureseitenketten, eine Reduktion von problematischen (d. h. teuren oder potentiell toxischen) Lösungsmitteln und Reagenzien und sogar die Möglichkeit, den Katalysator wiederzuverwenden. Ein großer Nachteil ist die oft als Nebenreaktion auftretende Proteolyse, entweder an dem zu kuppelnden Rest oder an anderen Aminosäuren in den Reaktanden, die die Selektivitätskriterien des Enzyms erfüllen. Des Weiteren besteht meist die Notwendigkeit, die Reaktionsbedingungen für jeden Einzelfall separat zu optimieren.

Ein erst seit wenigen Jahren zur Proteinligation verwendetes Enzym ist Sortase A. Es besitzt eine aus mindestens fünf Aminosäuren bestehende Erkennungssequenz, die sehr selten in Säugerproteinen vorkommt, weshalb proteolytische Spaltungen an anderen Stellen in den Reaktanden nicht auftreten. Außerdem weist sie von Natur aus nur eine geringe proteolytische Aktivität auf. Aus diesem Grund sollte Hydrolyse während der Ligation ebenfalls kein Problem darstellen.

### 1.3. Die Transpeptidase Sortase

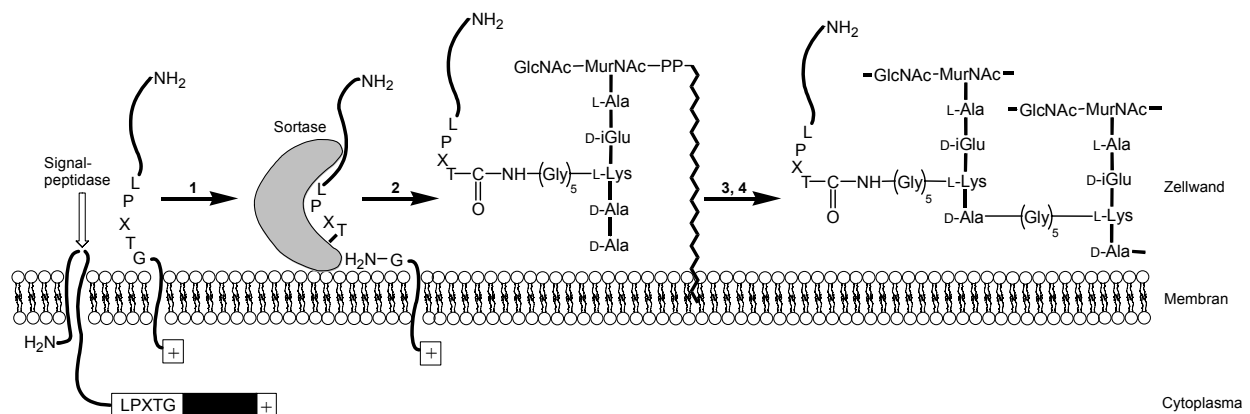
Sortasen<sup>[42]</sup> sind Transpeptidasen, die in grampositiven Bakterien vorkommen. Die *Staphylococcus aureus* Sortase Isoform Sortase A (SrtA) schneidet Proteine wie **1** an einem konservierten Leu-Pro-Xaa-Thr-Gly (LPXTG)-Motiv zwischen Threonin und Glycin. Dabei wird unter Abspaltung der Abgangsgruppe **4** ein Threonyl-Thiolester mit der Sulfhydrylgruppe des Cysteins (Cys<sup>184</sup>) im aktiven Zentrum des Enzyms gebildet. In einem zweiten Schritt wird das Acylfragment auf die N-terminale Aminogruppe eines Oligoglycins (**2**) übertragen, wodurch das Konjugat **3** entsteht (Schema 10).<sup>[43]</sup>



**Schema 10.** Sortase A-vermittelte Transpeptidierung ( $\text{R}^1$ ,  $\text{R}^2$ ,  $\text{R}^3$  = Peptid oder Protein;  $n \geq 1$ ).

*In vivo* vermittelt diese Reaktion die kovalente Anknüpfung von Oberflächenproteinen, die wichtige Faktoren für die Virulenz und Kolonisierung der betreffenden Bakterien darstellen, an die Aminogruppe der Pentaglycinbrücke von Vorläufern der bakteriellen Zellwand (Abbildung 2).<sup>[44,45]</sup> Daher rührt auch der Name Sortase: Die Proteine mit dem richtigen Erkennungssignal (*sorting signal*) werden im sogenannten *cell wall sorting pathway* durch das Enzym an die Zellwand geknüpft. Eine weitere und erstaunliche Funktion der Sortasen ist ihre Beteiligung an der Bildung von Pili in grampositiven Bakterien. Die eher von gramnegativen Bakterien bekannten Pili sind aus Proteinen bestehende fadenförmige, supramolekulare Fortsätze, die von mikrobiellen Oberflächen abstehen und die an ihrer Spitze oft adhäsive Aktivität besitzen.<sup>[46,47]</sup> Außerdem werden durch Sortasen Häm-bindende und -abbauende Proteine in der Zellwand verankert, die die Versorgung des Bakteriums mit dem wichtigen Nährstoff Eisen sicherstellen.<sup>[48,49]</sup>





**Abbildung 2.** Anknüpfung von Proteinen an die Zellwand grampositiver Bakterien: Die Vorläufer der Oberflächenproteine werden im bakteriellen Zytoplasma synthetisiert und besitzen ein N-terminales Signalpeptid und ein C-terminales Erkennungssignal. Dieses besteht aus einem LPXTG-Erkennungsmotiv gefolgt von einer hydrophoben Domäne (schwarzes Rechteck) und einem C-Terminus aus positiv geladenen Resten (+). Nach der Spaltung des N-terminalen Signalpeptids halten die hydrophobe Domäne und der C-Terminus den Vorläufer des Oberflächenproteins in der Membran zurück. Das Protein wird durch die membranständige Sortase gespalten, wobei ein Acyl-Enzymintermediat und das gespaltene Erkennungssignal entstehen (1). Der Acylrest wird durch den nucleophilen Angriff der Aminogruppe der Pentaglycinbrücke des Zellwand-Vorläufermoleküls Lipid II auf diese übertragen (2). Die an Lipid II gebundenen Oberflächenproteine werden mittels Transglycosylierungs- und Transpeptidierungsreaktionen in die sich bildende Zellwand inkorporiert (3,4).<sup>[50]</sup>

Für Sortasen codierende Gene und entsprechende Substrate wurden in fast allen grampositiven Bakterien gefunden, oft sogar mehr als ein Gen pro Organismus.<sup>[51]</sup> Es wurde vorgeschlagen, aufgrund von Sequenzhomologien eine Klassifizierung der Sortasen in A, B, C und D vorzunehmen.<sup>[52]</sup> Die Substrate der verschiedenen Sortasen besitzen dabei je nach Spezies leicht bis stärker abweichende Erkennungsmotive. So erkennt Sortase B aus *S. aureus* ein Protein mit einem NPQTN-Motiv, welches eine Rolle bei der Akquisition von Eisen spielt.<sup>[49a,53]</sup>

Die durch Sortase an der Zellwand befestigten Proteine sind wichtige Faktoren für die Pathogenität der entsprechenden Mikroorganismen.<sup>[54]</sup> Während die Abwesenheit von Sortase weder Teilung noch Wachstum von Zellen beeinflusst, konnte in Tiermodellen durch Infektion mit Wildtyp- und *knock out*-Stämmen gezeigt werden, dass Sortasen ein entscheidender Faktor für die Virulenz von *Staphylococcus aureus*,<sup>[49a,55]</sup> *Streptococcus pneumoniae*,<sup>[56]</sup> *Streptococcus mutans*,<sup>[57]</sup> *Streptococcus gordonii*,<sup>[58]</sup> *Streptococcus algalactiae*<sup>[59]</sup> und *Listeria monocytogenes*<sup>[60]</sup> sind. Infolgedessen werden Inhibitoren für Sortase als potentielle Antibiotika gesucht.<sup>[61]</sup> So wurde von Schneewind *et al.* gezeigt, dass Methanthiosulfonate oder Organoquecksilberverbindungen inhibitorische Effekte auf die Sortase-Reaktion durch Blockierung der Thiolgruppe des katalytisch aktiven

Cysteins haben.<sup>[62]</sup> Von einer koreanische Gruppe wurden verschiedene gegen Sortase wirksame Stoffe aus natürlichen Quellen gewonnen. Neben Extrakten aus zu medizinischen Zwecken verwendeten Pflanzen<sup>[63]</sup> vermögen auch isolierte Naturstoffe wie ein Lipid–Glucose-Konjugat aus *Fritillaria verticillata*,<sup>[64]</sup> Isoquinolinalkaloide aus *Coptis chinensis*,<sup>[65]</sup> Curcumin aus *Curcuma longa* L.<sup>[66]</sup>, Bis(indol)alkaloide aus dem Schwamm *Spongisorites* sp.,<sup>[67]</sup> Psammaplin A1 aus dem Schwamm *Aplysinella Rhax*,<sup>[68]</sup> Flavonole aus *Rhus verniciflua*<sup>[69]</sup> und Aaptamine aus dem tropischen Schwamm *Aaptos aaptos*<sup>[70]</sup> die Sortase-vermittelte Ligation zu inhibieren. In einem *in vitro* Test verschiedener dieser Inhibitoren zeigten diese keine Reduktion des bakteriellen Wachstums, aber eine Inhibition der Bindung der Bakterien an auf Trägern fixiertes Zellmatrixprotein Fibronectin.<sup>[68]</sup> Bei der Untersuchung von Bibliotheken verschiedener kleiner Moleküle (*small molecules*) wurden wirksame Inhibitoren wie Vinylsulfone,<sup>[71]</sup> Diarylacrylonitrile<sup>[72]</sup> oder Aryl( $\beta$ -amino)ethylketone<sup>[73]</sup> gefunden. Des Weiteren wurden einige Inhibitoren auf der Basis des natürlichen Peptid-Substrates der Sortase synthetisiert wie ein Peptidyl Diazomethan, ein Peptidylchloromethan<sup>[74]</sup> oder ein Peptidylvinylsulfon,<sup>[75]</sup> die irreversibel an das Cystein im aktiven Zentrum der Sortase binden. Auf der Suche nach einem Übergangszustandsanalogon, welches als reversibler kompetitiver Inhibitor wirkt, wurde ein Phosphinopeptid gefunden, das jedoch nur schwache inhibitorische Aktivität besitzt.<sup>[76]</sup>

Kinetische Studien weisen auf einen Ping-Pong-Bi-Bi-Mechanismus<sup>[77]</sup> mit einer als Parallelreaktion ablaufenden Hydrolyse für rekombinante Sortase A hin.<sup>[78]</sup> Ist ein Nucleophil vorhanden, ist die Bildung des Acyl-Enzymintermediats geschwindigkeitsbestimmend, bei Abwesenheit eines Nucleophils die Hydrolysereaktion. Diese Ergebnisse wurden gestützt durch die massenspektrometrische Detektion des Enzym-Substratkomplexes.<sup>[78,79]</sup> Der Mechanismus der Transpeptidierung konnte sowohl durch die Analyse der NMR-<sup>[80]</sup> und Röntgenkristallstruktur<sup>[81]</sup> von Sortase A und ihrem Substratkomplex als auch durch Mutagenesestudien<sup>[82]</sup> weiter verfeinert werden. Sortase A ist außerdem deutlich restriktiver in Bezug auf das Erkennungsmotiv als die oben erwähnten Proteasen, wie *in vitro* bestimmt wurde.<sup>[83]</sup> So wurde gezeigt, dass das Enzym eine starke Präferenz für Leucin in Position P<sub>4</sub>, Prolin in P<sub>3</sub>, Threonin in P<sub>1</sub> und Glycin in P<sub>1</sub>' besitzt. D. h. Substitutionen an diesen Positionen führten in fast allen Fällen dazu, dass keine Transpeptidierung der entsprechenden Substrate erfolgte. Variation an der Position P<sub>2</sub> ergab dieselben Ausbeuten an Produkt mit nur leichten Unterschieden in der Reaktionsgeschwindigkeit. Darüber hinaus wurden unter den

Bedingungen zur Bestimmung der Anfangsgeschwindigkeiten ausschließlich Substrate mit LPXTG-Motiv erkannt.

Die Potenz der Transpeptidase Sortase A als Synthesewerkzeug wurde schnell erkannt. So führten Mao *et al.* bei Beginn der eigenen Arbeiten Sortase-vermittelte Ligation als neue Methode zur Peptid- und Proteinligation ein.<sup>[84]</sup> Ein grün fluoreszierendes Protein (GFP) mit C-terminalem LPXTG-Motiv (GFP-LPETG-His<sub>6</sub>) wurde sowohl an Peptide mit N-terminalen Glycinresten als auch an ein 29 kDa Protein (Gly-emGFP) mit N-terminalem Glycinrest gekuppelt. Außerdem waren Ligationen an nicht-native Nucleophile wie das Peptid D-Tat (GyGrkkrrqrrr), ein synthetisches, verzweigtes Peptid {(PTD5-Ahx)<sub>2</sub>KYK(G<sub>2</sub>); PTD5 = RRQRRTSKLMKR} und ein derivatisiertes Folat {G<sub>3</sub>K(Folat)} erfolgreich, jedoch teilweise mit geringen Ausbeuten.

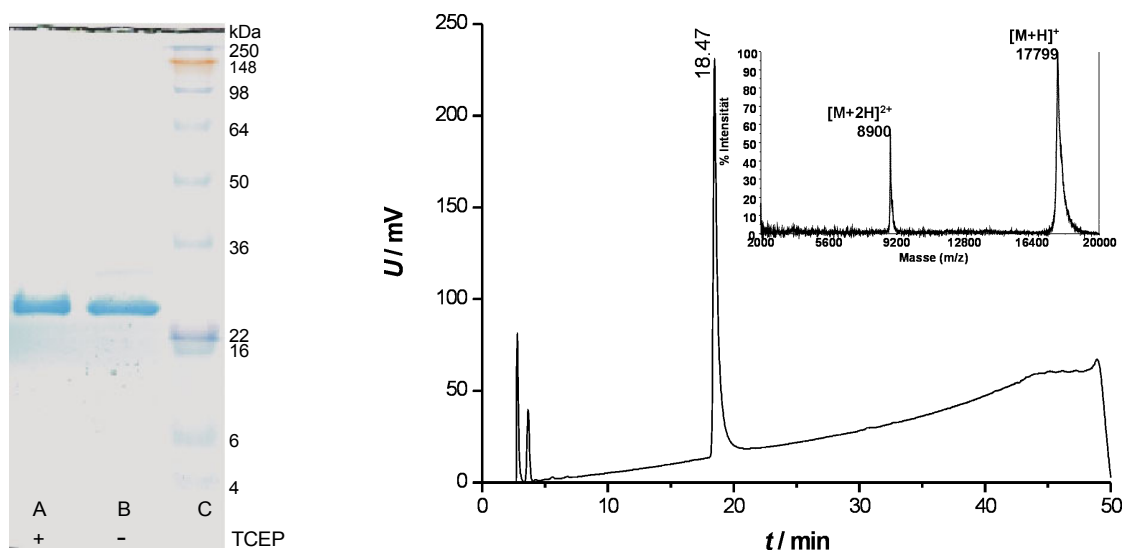
#### **1.4. Zielstellung**

Im Rahmen dieser Arbeit sollte das nicht kommerziell erhältliche Enzym Sortase A rekombinant gewonnen werden und die Transpeptidierungsreaktion für synthetische Zwecke hinsichtlich Erkennungsmotiv, Nucleophilsequenz und Reaktionsbedingungen untersucht und optimiert werden. Die praktische Anwendbarkeit der Sortase-vermittelten Ligation sollte anhand der Verknüpfung von Peptidnucleinsäuren und Peptiden, der Fluoreszenzmarkierung von Proteinen sowie beim Aufbau komplexer Proteine demonstriert werden.

## 2. Ergebnisse und Diskussion

### 2.1. Expression und Reinigung von Sortase

Aus *S. aureus* wurde die genomische DNA isoliert und mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) die Sequenz amplifiziert, die für die lösliche Form von Sortase A ohne N-terminale Signalsequenz codiert ( $\text{SrtA}_{\Delta\text{N59}}$ ).<sup>[84]</sup> Nach Ligation in einen Plasmidvektor und nachfolgender Transformation von *E. coli* Zellen wurde das Enzym in *E. coli* mit einem C-terminalen His<sub>6</sub>-Tag exprimiert. Reinigung der Sortase A erfolgte mittels Affinitätschromatographie an immobilisierten Metallionen ( $\text{Co}^{2+}$ ) (*immobilized metal-ion affinity chromatography*, IMAC). Reduktion und anschließende Dialyse gegen physiologischen Puffer ergab Sortase A, die ohne weitere Rückfaltungsschritte aktiv war. Da das Enzym durch  $\text{Ca}^{2+}$  aktiviert wird, wurde mit calciumhaltigen Puffern gearbeitet.<sup>[85]</sup> Das Produkt wurde mittels SDS-PAGE, HPLC und MALDI-MS analysiert (Abbildung 3). Bei der Gelelektrophorese zeigte das Enzym eine scheinbar höhere Masse (ca. 25 kDa), als es besitzt (ca. 18 kDa). Dieses Phänomen ist aus der Literatur bekannt.<sup>[86]</sup> Die HPLC zeigte einen Einzelpeak ohne Verunreinigungen und die MALDI-Massenspektrometrie die korrekte Masse.



**Abbildung 3.** Links: SDS-PAGE von gereinigter Sortase A: Bahn A mit, Bahn B ohne Reduktion; Bahn C Molmassenmarker (in kDa). Rechts: Chromatogramm und MALDI-Massenspektrum der gereinigten Sortase A.

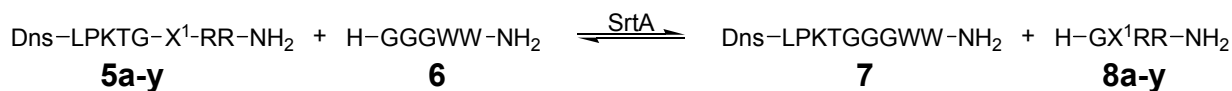
## 2.2. Optimierung der Sortase-vermittelten Ligation

### 2.2.1. Charakterisierung der Erkennungssequenz<sup>[87]</sup>

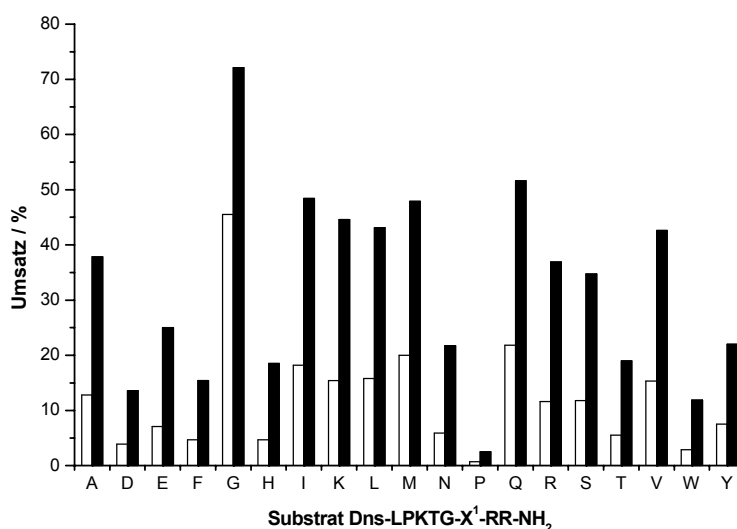
Da das Produkt **3** der Sortase-vermittelten Ligation das entscheidende LPXTG-Erkennungsmotiv genauso wie das Substrat **1** enthält, stellt es ein mögliches Substrat für die Ligation zusammen mit dem Nebenprodukt **4** dar (Schema 10, S. 12). Daher ist es möglich, dass sich ein Gleichgewicht bei der Reaktion einstellt. Obwohl, wie in der Einleitung beschrieben, der Mechanismus der Transpeptidierung recht gut verstanden ist, war die Existenz eines solchen Gleichgewichts und dessen Bedeutung für die Anwendung von Sortase A in der Synthese bisher nicht bekannt. Dagegen sind Reaktionen beschrieben, die unter Einsatz eines fünffachen Überschusses eines Ausgangsstoffs mit Umsätzen bis zu 90% ablaufen.<sup>[83,84]</sup> Ausbeuten dieser Größenordnung konnten in Vorversuchen zu dieser Arbeit mit Substrat/Nucleophil-Verhältnissen von 1/1 jedoch nicht erreicht werden, wodurch sich die Frage stellte, welche Bedingungen die Reaktion kontrollieren. Um diese Ligation synthetisch nutzbar zu machen, muss das Gleichgewicht auf die Seite der Produkte verschoben werden.

Zur Verbesserung der Ausbeuten wurde zuerst das Substrat optimiert. Der Rest R<sup>1</sup> N-terminal vom Erkennungsmotiv sollte nur einen geringen Einfluss ausüben, da er sowohl im Substrat **1**, als auch im Produkt **3** unverändert vorliegt. Der Unterschied zwischen diesen beiden Molekülen besteht in den Resten C-terminal des LPXTG-Motivs R<sup>2</sup> bzw. Gly<sub>(n-1)</sub>R<sup>3</sup>. Hier sollten die Aminosäurereste, die sich dichter an der Spaltstelle und damit am aktiven Zentrum des Enzyms befinden, den größten Einfluss ausüben. Um nun die Wirkung der Reste X<sup>1</sup> bzw. X<sup>2</sup> an den Positionen P<sub>2</sub>' bzw. P<sub>3</sub>' zu untersuchen, wurden zwei Peptidbibliotheken synthetisiert (zur Nomenklatur siehe auch Abbildung 1, S. 9). In beiden Bibliotheken wurde Lysin als Rest X im LPXTG-Motiv verwendet. Durch die protonierte Aminofunktion der Lysinseitenkette wurde eine gute Löslichkeit im verwendeten Reaktionspuffer und eine gute Detektierbarkeit mit massenspektrometrischen Methoden gesichert. Für die X<sup>1</sup>-Bibliothek (Schema 11) wurden kleine Dansyl-markierte Peptide (**5**) mit LPKTGX<sup>1</sup>-Motiv synthetisiert. Der Rest X<sup>1</sup> steht hier für die proteinogenen Aminosäuren mit der Ausnahme von Cystein, da die Peptide mit dieser Aminosäure unter den Reaktionsbedingungen oxidativ über Cystinbrücken dimerisierten. Das Pentapeptid **6** wurde als Nucleophil gewählt, da so die zwei hydrophilen Argininreste der Abgangsgruppe durch zwei hydrophobe Tryptophane

ersetzt wurden. Dadurch waren in allen Experimenten das Produkt **7** und das Substrat **5** mittels Umkehrphasen-HPLC mit Fluoreszenzdetektion separier- und quantifizierbar.



**Schema 11.** Die  $X^1$ -Bibliothek für die Optimierung des Aminosäurerestes in  $P_2'$  Position in der Sortase-vermittelten Ligation.

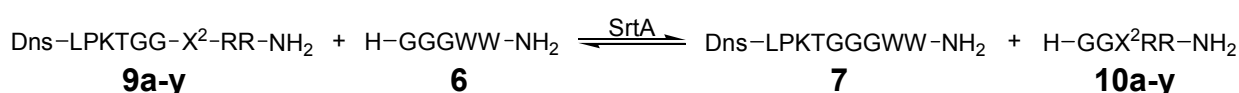


**Abbildung 4.** Ausbeute der Sortase-vermittelten Ligation, gezeigt durch den Umsatz von Substrat **5** zum Produkt **7** in Abhängigkeit vom Aminosäurerest  $X^1$  des LPKTGX<sup>1</sup>-Motivs nach 7 h und 24 h (weiße bzw. schwarze Balken). Die Umsätze wurden mittels HPLC mit Fluoreszenzdetektion bestimmt.

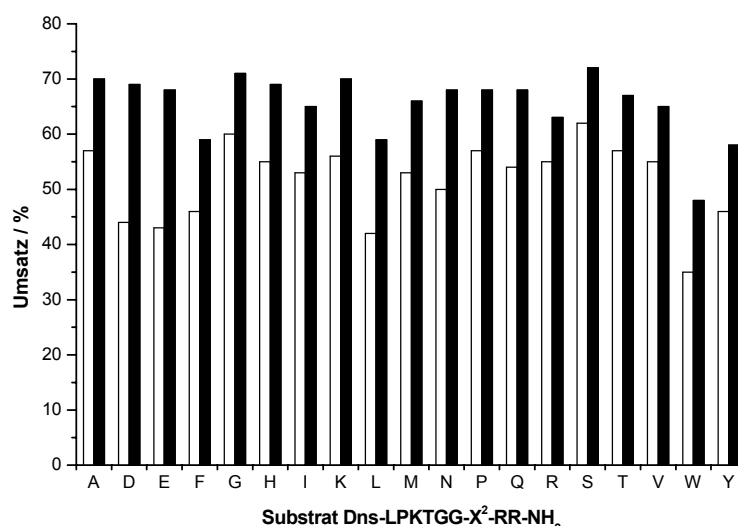
Die Ergebnisse der Ligationen aus der  $X^1$ -Bibliothek belegten deutlich einen Einfluss des Restes  $X^1$  (Abbildung 4). Während Glycin an dieser Position die schnellste Reaktion und den größten Umsatz (ca. 70% nach 24 h) erbrachte, führten einige Reste mit sterisch anspruchsvollen Seitenketten (Isoleucin, Leucin, Methionin, Glutamin, Valin) und ein positiv geladener Rest (Lysin) zu moderaten Umsätzen von ca. 50% nach 24 h. Alle anderen Aminosäuren wiesen geringere Umsätze auf, mit dem niedrigsten bei Prolin (kleiner 5% nach 24 h). Interessanterweise lieferte die Suche in einer für natürlich vorkommende Sortasesubstrate spezifischen Datenbank folgende Aminosäuren in dieser Position:<sup>[88,89]</sup> Asparaginsäure (23%), Glutaminsäure (23%), Serin (13%), Glycin (12%) und Threonin (7%). Prolin war nur ein einziges Mal an dieser Position in den 792

gefundenen Proteinen vorhanden, d. h. in der Natur kommen Sortasesubstrate mit LPXTGP-Motiv praktisch nicht vor.

Um die Bedeutung des Restes in der Position  $P_3'$  zu bestimmen, wurde eine  $X^2$ -Bibliothek Dns-LPKTGGX<sup>2</sup>RR-NH<sub>2</sub> (**9**) synthetisiert, d. h. das Pentapeptid-Motiv gefolgt von Glycin (dem besten Treffer der ersten Bibliothek) und einer anderen Aminosäure. Diese Substrate wurden mit dem Nucleophil **6** wie die  $X^1$ -Bibliothek umgesetzt, was zum gleichen Produkt **7** führte (Schema 12).



**Schema 12.** Die  $X^2$ -Bibliothek für die Optimierung des Aminosäurerestes in  $P_3'$  Position in der Sortase-vermittelten Ligation.



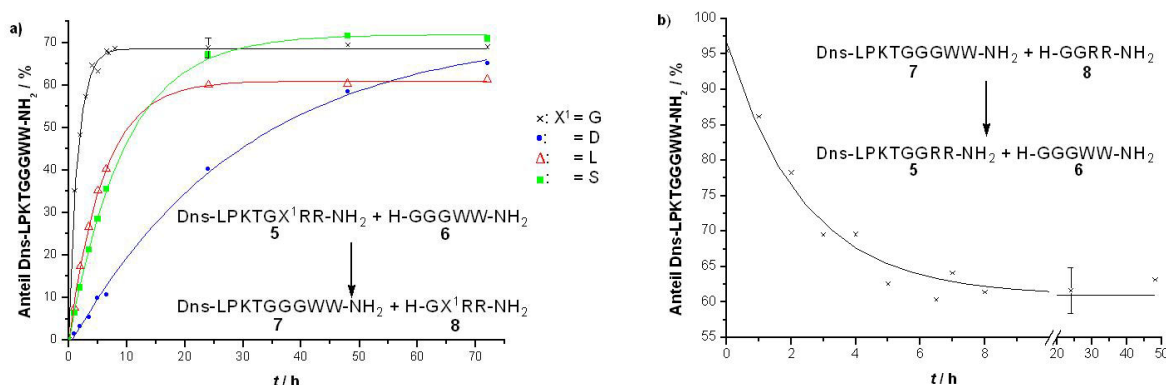
**Abbildung 5.** Ausbeute der Sortase-vermittelten Ligation, gezeigt durch den Umsatz von Substrat **9** zum Produkt **7** in Abhängigkeit vom Aminosäurerest  $X^2$  des LPKTGGX<sup>2</sup>-Motivs nach 7 h und 24 h (weiße bzw. schwarze Balken). Die Umsätze wurden mittels HPLC mit Fluoreszenzdetektion bestimmt.

Wie in Abbildung 5 zu sehen ist, waren nach 24 h alle Reaktionen ähnlich effizient verlaufen. Dies zeigte die Unabhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Aminosäure an Position  $P_3'$ .

Es stellte sich die Frage, ob die Unterschiede für die  $X^1$ -Bibliothek von unterschiedlichen Gleichgewichtskonstanten herrühren oder kinetische Effekte

verantwortlich sind. Dazu wurden einige Substrate **5** ( $X^1 = \text{G, D, L oder S}$ ) wie zuvor umgesetzt und die Bildung der Produkte über einen Zeitraum von 72 h verfolgt (Abbildung 6a). Überraschenderweise erreichten die Reaktionen alle in etwa den gleichen Umsatz, aber mit deutlich unterschiedlichen Reaktionsgeschwindigkeiten. Während die Reaktion mit Glycin in dieser Position am schnellsten verlief, erreichte sie mit Asparaginsäure kaum den Gleichgewichtszustand nach 72 h.

Als direkten Beweis für die Existenz eines Gleichgewichts wurde die Rückreaktion untersucht. Dazu wurde von den synthetisierten Peptiden **7** und **8** ausgegangen ( $X^1 = \text{G}$ , Abbildung 6b), den Produkten der Hinreaktion (Abbildung 6a, schwarze Kreuze). Wie man sehen kann, lief die Reaktion in dieselbe Gleichgewichtslage, unabhängig vom Ausgangspunkt.



**Abbildung 6.** Erreichen der Gleichgewichtslage bei der Sortase-vermittelten Transpeptidierung. a) Vier Substrate **5** (Dns-LPKTGX<sup>1</sup>RR-NH<sub>2</sub>) wurden mit demselben Nucleophil **6** umgesetzt:  $X^1 = \text{G}$  (×);  $X^1 = \text{D}$  (•);  $X^1 = \text{L}$  (Δ);  $X^1 = \text{S}$  (■). b) Verlauf der Rückreaktion. Für alle Reaktionen ist der Anteil desselben Moleküls (**7**) gezeigt, das Produkt bei der Reaktion links (a) und Substrat bei der Reaktion rechts (b) ist.

Darüber hinaus besitzen auch Reste, die weiter von der Spaltstelle entfernt liegen, einen Einfluss auf das Gleichgewicht. Substrate (Dns-LPKTGGGX<sup>3</sup>X<sup>3</sup>-NH<sub>2</sub>) bei denen drei Glycinreste und zwei Arginin- bzw. Tryptophanreste auf die Spaltstelle folgen, wurden mit Nucleophilen des Typs H-GGGX<sup>4</sup>X<sup>4</sup>-NH<sub>2</sub> ( $X^4 = \text{G, R oder W}$ ) umgesetzt (Tabelle 1). Nachdem die Reaktionen den Gleichgewichtszustand erreicht hatten, wurde der Umsatz bestimmt. Es ist bekannt, dass bei Gegenwart eines Glycinnucleophils der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Transpeptidierung die Bildung des Threonylthioesters ist, d. h. die Spaltung des Substrats.<sup>[78]</sup> Dies bedeutet, dass ein Produkt/Substrat-Verhältnis  $\neq 1$  ein Indikator für eine unterschiedliche Erkennung des



Substrats und des Produkts durch die Sortase ist. Die Ergebnisse zeigen, dass die Reste  $X^3$  bzw.  $X^4$  die Lage des Gleichgewichts beeinflussen. Das Gleichgewicht wird in der Reihenfolge  $G > R > W$  für die Reste  $X^3$  im Substrat nach rechts verschoben.

**Tabelle 1.** Verhältnis Produkt/Substrat im Gleichgewicht bei der Sortase-vermittelten Ligation von Dns-LPKTGGGX<sup>3</sup>X<sup>3</sup>-NH<sub>2</sub> mit H-GGGX<sup>4</sup>X<sup>4</sup>-NH<sub>2</sub>.

Nr.	Substrat	Nucleophil	% Produkt <sup>a</sup>	Verhältnis Produkt/Substrat <sup>a</sup>
1	Dns-LPKTGGGRR-NH <sub>2</sub>	H-GGGGG-NH <sub>2</sub>	39 ± 2	0.63
2	Dns-LPKTGGGRR-NH <sub>2</sub>	H-GGGWW-NH <sub>2</sub>	61 ± 4	1.6
3	Dns-LPKTGGGWW-NH <sub>2</sub>	H-GGGRR-NH <sub>2</sub>	41 ± 2	0.69
4	Dns-LPKTGGGWW-NH <sub>2</sub>	H-GGGGG-NH <sub>2</sub>	31 ± 3	0.45

<sup>a</sup> Im Gleichgewicht.

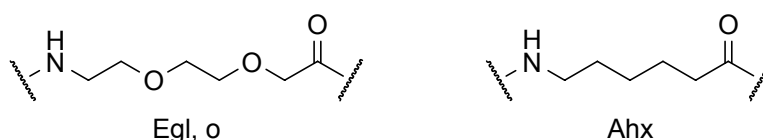
Ein Einfluss des P<sub>2</sub>'-Restes wird nur selten in der Literatur beschrieben.<sup>[89,90]</sup> Aus der Röntgenkristallstruktur<sup>[81]</sup> von Sortase A wird deutlich, dass sich das aktive Zentrum des Enzyms (Cys<sup>184</sup>) in einer tunnelartigen, hydrophoben Spalte befindet. Diese Spalte weist auf Höhe des S<sub>2</sub>'-Bindungsplatzes einen Knick auf, so dass der entsprechenden Aminosäure an P<sub>2</sub>'-Position eine Turnkonformation aufgezwungen wird. Glycin ist durch die Abwesenheit einer Seitenkette die flexibelste Aminosäure – entsprechend wurden mit diesem Rest in der X<sup>1</sup>-Bibliothek die höchsten Umsätze erzielt. Prolin hingegen induziert Turns, allerdings in diesem Fall offenbar in eine sterisch ungünstige Richtung, so dass das entsprechende Substrat nicht erkannt wurde. Bei der Transpeptidierungsreaktion taucht das Substrat mindestens bis zu dem P<sub>4</sub>'-Rest in die hydrophobe Spalte ein, was den Einfluss der Reste bis zu dieser Position auf den Reaktionsverlauf erklärt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Substraterkennung durch Sortase A nicht ausschließlich auf das LPXTG-Erkennungsmotiv beschränkt ist. Vielmehr beeinflussen die C-terminal darauf folgenden Reste sowohl die Kinetik als auch die Gleichgewichtslage der Reaktion, was bei der Konstruktion optimaler Substrate berücksichtigt werden muss. Daher wurden im Folgenden stets Substrate mit Glycin an der Position P<sub>2</sub>' verwendet.

### 2.2.2. Vergleich verschiedener Nucleophile und Abgangsgruppen

Um die Sortase-vermittelte Ligation weiter zu charakterisieren, sollte nun der Einfluss verschiedener Nucleophile untersucht werden. Da die Nucleophile bei der Rückreaktion die Rolle der Abgangsgruppe einnehmen, wurden die entsprechenden Substrate ebenfalls untersucht (Tabelle 2). Gesetzt den Fall man fände ein Nucleophil, welches in guten Ausbeuten umgesetzt würde, aber das entstehende Produkt würde kein Substrat darstellen, wäre dies eine Möglichkeit, das Gleichgewicht vollständig auf die Seite der Produkte zu verschieben.

Es ist aus der Literatur bekannt, dass Sortase Glycinamid als Nucleophil akzeptiert, Glycin jedoch nicht (Tabelle 2, Nr. 3).<sup>[79]</sup> Dies ist vermutlich dadurch bedingt, dass Glycin als freie Säure unter den experimentellen Bedingungen zwitterionisch vorliegt ( $\text{H}_2^+\text{-Gly-O}^-$ ). Entsprechend wurde untersucht, ob das Substrat Dns-LPKTG-OH, welches Gly-OH als Abgangsgruppe enthält, erkannt wird (Nr. 2). Die Versuche zu der ersten Peptidbibliothek haben gezeigt, dass ein Substrat mit Prolin an Position  $\text{P}_2'$  ein sehr schlechtes Substrat darstellt (Nr. 4), weshalb geprüft wurde, ob ein Nucleophil mit diesem Rest an der entsprechenden Position erkannt wird (Nr. 5). Des Weiteren wurden Aminoethylenglykol (Egl, o) und  $\epsilon$ -Aminohexansäure (Ahx) sowohl als Abgangsgruppe im Substrat und als Nucleophil verwendet (Abbildung 7 und Tabelle 2, Nr. 6-9).



**Abbildung 7.** Verwendete unnatürliche Abgangsgruppen und Nucleophile: Ethylenglykollinker (Egl, o) und  $\epsilon$ -Aminohexansäure (Ahx).

**Tabelle 2.** Umsätze nach 24 h bei der Sortase-vermittelten Ligation unter Verwendung von unnatürlichen Abgangsgruppen und Nucleophilen. Die jeweils wesentliche Änderung ist **fett** gedruckt hervorgehoben.

Nr.	Substrat	Nucleophil	Umsatz	Lit.
1	Dns-Leu-Pro-Lys-Thr-Gly-Gly-Arg-Arg-NH <sub>2</sub>	H-Gly-Gly-Gly-Trp-Trp-NH <sub>2</sub>	72%	<sup>a</sup>
2	Dns-Leu-Pro-Lys-Thr-Gly- <b>OH</b>	H-Gly-Gly-Gly-Trp-Trp-NH <sub>2</sub>	0%	<sup>a</sup>
3	Abz-Leu-Pro-Glu-Thr-Gly-Dnp	H-Gly- <b>OH</b>	0%	[79]
4	Dns-Leu-Pro-Lys-Thr-Gly- <b>Pro</b> -Arg-Arg-NH <sub>2</sub>	H-Gly-Gly-Gly-Trp-Trp-NH <sub>2</sub>	2%	<sup>a</sup>
5	Dns-Leu-Pro-Lys-Thr-Gly-Gly-Arg-Arg-NH <sub>2</sub>	H-Gly- <b>Pro</b> -Gly-Trp-Trp-NH <sub>2</sub>	13%	<sup>a</sup>
6	Dns-Leu-Pro-Lys-Thr- <b>Egl</b> -NH <sub>2</sub>	H-Gly-Gly-Gly-Trp-Trp-NH <sub>2</sub>	2%	<sup>a</sup>
7	Dns-Leu-Pro-Lys-Thr-Gly-Gly-Arg-Arg-NH <sub>2</sub>	H- <b>Egl</b> -Trp-Trp-NH <sub>2</sub>	17%	<sup>a</sup>
8	Dns-Leu-Pro-Lys-Thr- <b>Ahx</b> -NH <sub>2</sub>	H-Gly-Gly-Gly-Trp-Trp-NH <sub>2</sub>	0%	<sup>a</sup>
9	Dns-Leu-Pro-Lys-Thr-Gly-Gly-Arg-Arg-NH <sub>2</sub>	H- <b>Ahx</b> -Trp-Trp-NH <sub>2</sub>	0%	<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Diese Arbeit.

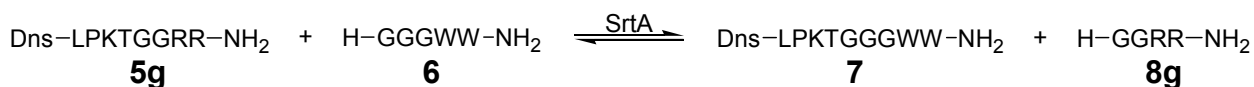
Glycin (Gly-OH) wurde weder als Abgangsgruppe noch als Nucleophil vom Enzym erkannt (Nr. 2 und 3). Die Substrate mit Prolin oder dem Ethylenglykolbaustein wurden praktisch nicht umgesetzt (Nr. 4 und 6). Die entsprechenden Nucleophile konnten nur in sehr moderaten Ausbeuten an das Substrat geknüpft werden (Nr. 5 und 7). Interessanterweise wurde eine Aminogruppe an einem längerkettigen Alkan (fünf Methylengruppen im Fall der Aminohexansäure) weder als Nucleophil noch als Abgangsgruppe akzeptiert (Nr. 8 und 9). Dies war bemerkenswert, da gezeigt wurde, dass die Aminogruppe von *m*-Diaminopimelinsäure,<sup>[91]</sup> aber nicht die  $\epsilon$ -Aminogruppe von Lysin<sup>[92]</sup> in einigen grampositiven Bakterien als Nucleophil dient. Trägerfixiertes Aminoethylenglykol wurde kürzlich von Boder *et al.* als Nucleophil verwendet. Diese Gruppe nutzte Sortase A als Werkzeug für die Fixierung von Proteinen an Oberflächen.<sup>[93]</sup> Sie exprimierten ein grün fluoreszierendes Protein (*enhanced green fluorescent protein*, eGFP) mit C-terminalem LPETG-Motiv. Durch Sortase-vermittelte Ligation wurde dieses Protein sowohl an Harz gekoppelt, welches mit Gly<sub>3</sub> modifiziert war, als auch an PEG-Harz mit terminalen Aminogruppen, wenn auch im zweiten Fall mit deutlich verminderter Effizienz. Der daraus gezogene Schluss, dass Sortase einfache Aminoalkylgruppen als Nucleophil akzeptiert, scheint angesichts der oben diskutierten Ergebnisse jedoch sehr fragwürdig zu sein.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine Verbesserung der Ausbeuten mit den untersuchten Abgangsgruppen und Nucleophilen nicht zu erwarten ist.

### 2.2.3. Bestimmung der Aktivität des Enzyms in Gegenwart von Co-Solvenzien

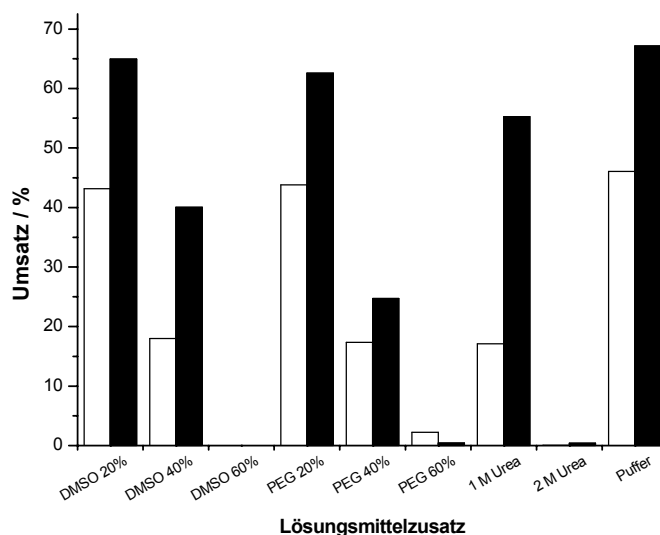
Bei der Verwendung von Enzymen ist es wichtig deren Aktivität quantifizieren zu können. Bei Sortase ist natürlich die Aktivität bei der Transpeptidierung gemeint. Eine ausschließliche Bestimmung der Spaltung des Substrates, z. B. durch Verwendung eines Fluorophor-Quencher-Paares im Substrat und Messung der entstehenden Fluoreszenz – wie bei Proteasen üblich –, reicht hier nicht aus. Eine Möglichkeit besteht in der Verwendung von FRET-Paaren, wie z. B. Carboxyrhodamin im Substrat und Carboxyfluorescein im Nucleophil.<sup>[94]</sup> Bei diesem Ansatz wird die durch FRET vermittelte Fluoreszenz des Akzeptors nach Verknüpfung der beiden Moleküle gemessen.

Mit den bereits beschriebenen HPLC-Auswertungen des in Schema 13 gezeigten Systems lag eine einfache Möglichkeit vor die Aktivität von Sortase zu bestimmen. In der vorliegenden Arbeit wurde dies für verschiedene Lösungsmittelsysteme (dieser Abschnitt) und in Gegenwart von Peptidylketoaldehyd-Inhibitoren (Abschnitt 2.6) durchgeführt. Die relative Aktivität ergab sich aus dem Vergleich mit einer vorher festgelegten Standardreaktion.



**Schema 13.** Reaktion für die Bestimmung der Aktivität von Sortase A.

Ein generelles und häufig auftretendes Problem bei Peptid- und Proteinligationen ist die schlechte Löslichkeit der Substrate in wässrigen Puffern. Daher könnte es sinnvoll sein, die Reaktion in Gegenwart von organischen Additiven durchzuführen. Es wurde getestet, ob Dimethylsulfoxid (DMSO), Polyethylenglykol (PEG) oder Harnstoff (Urea) in verschiedenen Konzentrationen die Aktivität der Sortase im Vergleich zu wässrigem Puffer beeinflussen (Abbildung 8).<sup>[87]</sup>



**Abbildung 8.** Umwandlung von Substrat **5g** in Produkt **7** in verschiedenen Lösungsmittelsystemen nach 4 h und 24 h (weiße bzw. schwarze Balken).

Der Zusatz von 20% (V/V) DMSO oder PEG hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Aktivität der Sortase. Konzentrationen von 40% organischem Lösungsmittel verringerten die Produktbildung deutlich, bei 60% war keine Aktivität mehr messbar. Man kann also annehmen, dass der Zusatz von 20% DMSO oder PEG zur Erhöhung der Löslichkeit eines oder beider Edukte die Ausbeuten der Ligation nicht herabsetzt.<sup>[87]</sup> Harnstoff ist ein oft verwendeter löslichkeitsvermittelnder Zusatz für zu Aggregation neigende Proteine und Peptide. Während die Zugabe von Harnstoff in Konzentrationen bis zu  $1 \text{ mol l}^{-1}$  die Aktivität von Sortase nur geringfügig senkte, war das Enzym bei der doppelten Konzentration an Harnstoff vollständig inaktiv. Daher kommt auch Harnstoff in geringer Konzentration als lösungsvermittelnder Zusatz für die Sortase-vermittelte Ligation in Betracht.

## 2.3. Synthese von Konjugaten aus Peptidnucleinsäuren und zellpenetrierenden Peptiden

### 2.3.1. Einleitung

Peptidnucleinsäuren (PNAs) sind modifizierte Oligonucleotid-Analoga mit interessanten Eigenschaften.<sup>[95]</sup> Bei PNAs ist das Ribosephosphatrückgrat durch über Amidbindungen verknüpfte *N*-(2-Aminoethyl)glycineinheiten ersetzt (Abbildung 9). Durch dieses ungeladene Peptidrückgrat besitzt PNA mehrere Vorteile gegenüber den natürlichen Nucleinsäuren DNA und RNA. Durch die Abwesenheit eines negativ geladenen Rückgrates vermag PNA durch Stranginvasion in einen DNA-Duplex ein stabiles PNA–DNA-Hybrid mit hoher *mismatch* Diskriminierung zu bilden.<sup>[96]</sup> Es wurde außerdem gezeigt, dass PNA–DNA-Hybride stabiler sind als entsprechende DNA–DNA-Hybride.<sup>[97]</sup> Darüber hinaus sind PNAs, bedingt durch ihre ungewöhnliche Struktur, stabil gegen Abbau durch sowohl Proteasen als auch Nucleasen aus menschlichem Serum oder Zellextrakten.<sup>[98]</sup> Es ist daher nicht verwunderlich, dass eine beachtliche Anzahl von PNAs synthetisiert und für Antisense- oder Antigen-Untersuchungen verwendet wurde.<sup>[99]</sup> Einer therapeutischen Anwendung steht jedoch die geringe Membranpermeabilität dieser Substanzen im Weg. Eine Vermeidung dieses Problems erhoffte man sich durch Konjugation von PNAs an lipophile Moleküle, Peptide oder zellspezifische Rezeptorliganden.<sup>[100]</sup>

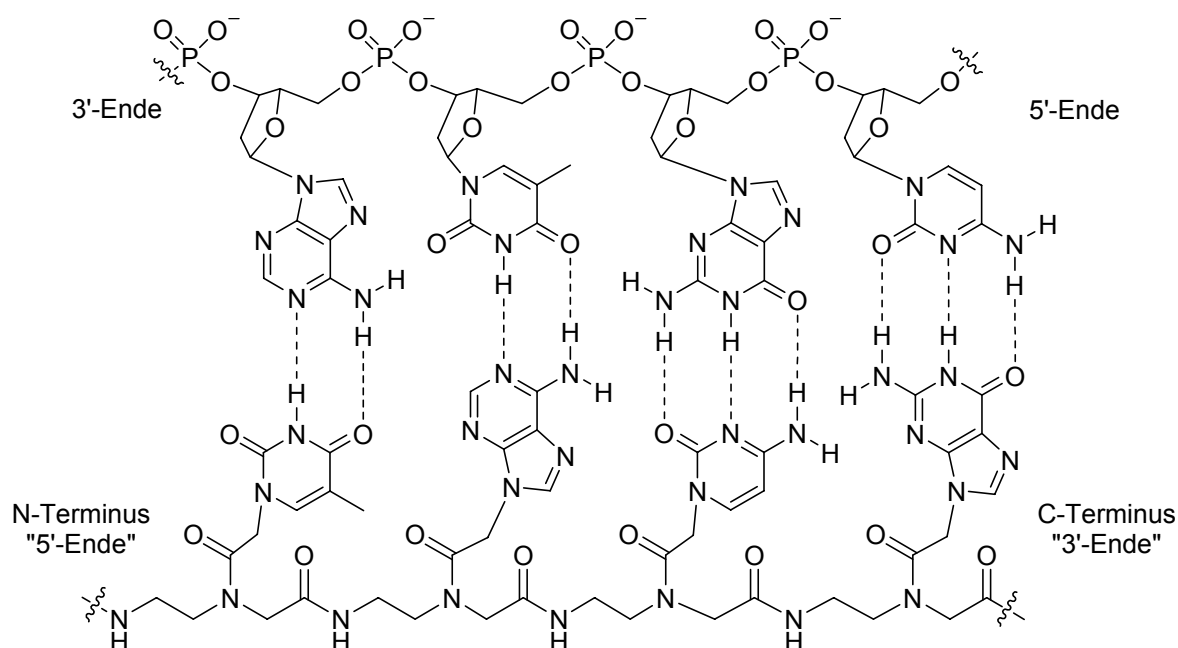


Abbildung 9. Ein PNA–DNA-Dimer.

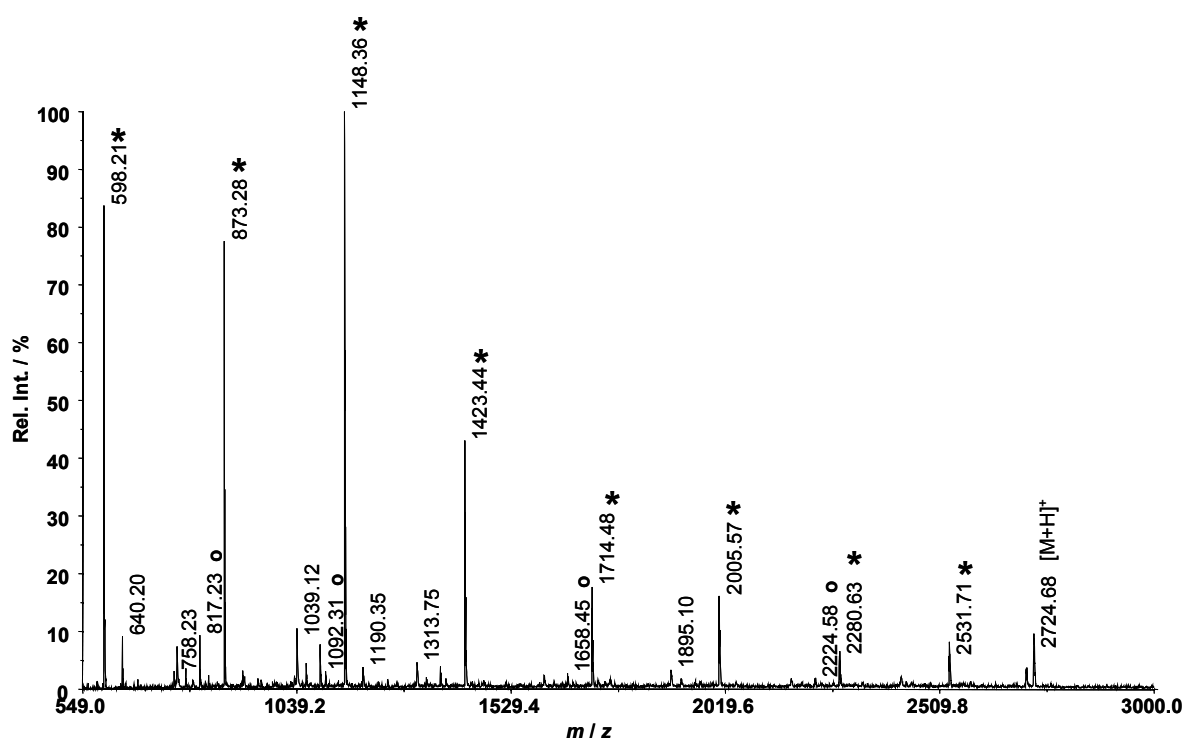
Zellpenetrierende Peptide (CPPs)<sup>[101]</sup> besitzen die Fähigkeit, biologische Membranen (wie z. B. Zellwände) zu passieren. Darüber hinaus können sie kovalent gebundene Moleküle in Zellen einschleusen. So wurde gezeigt, dass CPPs in der Lage sind PNAs in Säugerzellen zu schleusen und ihre biologische Aktivität zu erhöhen.<sup>[102]</sup> CPPs können aus einfachen kationischen Sequenzen bestehen, von Proteinen abgeleitet oder *de novo* designed sein.

Die Gruppe um Johannes Oehlke am FMP in Berlin beschäftigt sich unter anderem mit dem Transport von PNAs in Zellen, z. B. vermittelt durch zellpenetrierende Peptide, und ihrer biologischen Wirkung im Zellinneren. Bisherige Versuche zur Synthese von PNA–CPP-Konjugaten wurden nach den Prinzipien der Festphasenpeptidsynthese der gesamten Sequenz durchgeführt. Dabei wurde wahlweise zuerst die PNA am Harz synthetisiert und nachfolgend an deren N-Terminus das Peptid oder umgekehrt. Jedoch war diese Strategie häufig ineffizient, da die Konjugate, je nach Sequenz, zur Aggregation neigten. Dadurch wurde die Reinigung erschwert und das Produkt war mit Abbruchsequenzen verunreinigt (ein kürzlich erschienener Übersichtsartikel zur Synthese von Oligonucleotid–Peptid-Konjugaten findet sich in Lit.<sup>[103]</sup>). Um Probleme bei der Reinigung zu umgehen, sollten daher gereinigte Ausgangsstoffe mittels Sortase-vermittelter Ligation verknüpft werden. Die ersten überraschenden Herausforderungen traten jedoch schon bei der Synthese der PNA-Oligomere auf.

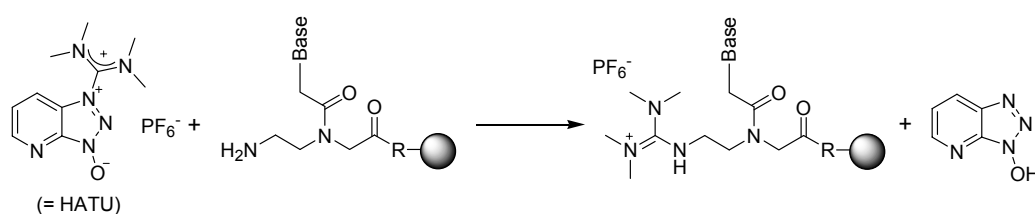
### 2.3.2. Synthese der PNA-Oligomere<sup>[104]</sup>

Es wurden verschiedene Verfahren zur Festphasensynthese von PNAs entwickelt. Analog zur Peptidsynthese finden hauptsächlich zwei verschiedene Schutzgruppenstrategien in der PNA-Synthese Anwendung: Boc-Schutzgruppen für die Aminofunktion des Peptidrückgrates und Z-<sup>[105,106]</sup> oder Benzoyl-Schutzgruppen<sup>[107]</sup> für die exocyclischen Aminofunktionen der Nucleobasen bzw. Fmoc-Schutz in Verbindung mit Bhoc-,<sup>[108,109]</sup> oder Z-Schutzgruppen.<sup>[110]</sup> Die Verwendung von Mmt/Acyl-Schutzgruppen<sup>[111]</sup> konnte sich nicht durchsetzen. Für die Aktivierung der PNA-Monomere können dieselben Reagenzien wie in der Peptidsynthese zum Einsatz kommen. So wurden z. B. DIC,<sup>[106,108]</sup> PyAOP<sup>[107]</sup> oder OPfp-Ester<sup>[110]</sup> verwendet, in der Praxis haben sich aber besonders HATU<sup>[112]</sup> oder PyBOP<sup>[113]</sup> durchgesetzt.<sup>[114]</sup> Die Synthese mit dem Guanidinium-abgeleiteten Kupplungsreagenz HATU ist aufwändiger, weil hier eine Voraktivierung nötig ist, um die Guanidinylierung des N-Terminus der wachsenden PNA-Kette zu vermeiden (Abbildung 10 und Schema 14). Diese

Nebenreaktion ist aus der Peptidsynthese bekannt<sup>[115]</sup> und wurde auch für die PNA-Synthese beschrieben.<sup>[116]</sup>



**Abbildung 10.** PNA-Synthese mit HATU ohne Voraktivierung. Das MALDI-Spektrum des Rohproduktes zeigt diverse Nebenprodukte, die den Abbruchsequenzen entsprechen (M: H-gca gga aag Cys(S $\beta$ Bu)-NH $_2$ , \*: guanidinylierte Abbruchsequenzen, o: acetylierte Abbruchsequenzen).



**Schema 14.** N-terminale Guanidinylierung als Nebenreaktion in der PNA-Synthese mit Guanidiniumreagenzien wie HATU.

Bei der Verwendung von PyBOP oder ähnlichen Phosphoniumreagenzien (wie BOP, PyBroP, PyAOP, etc.) wurden bisher keine solchen kettenabbrechenden Nebenreaktionen beschrieben.<sup>[117]</sup> Deshalb sollte auch keine Voraktivierung nötig sein, was besonders in der automatisierten Synthese nützlich ist. Daher wurde zunächst in der Synthese der für diese Arbeit benötigten PNAs die Aktivierung der Monomere mit PyBOP durchgeführt.

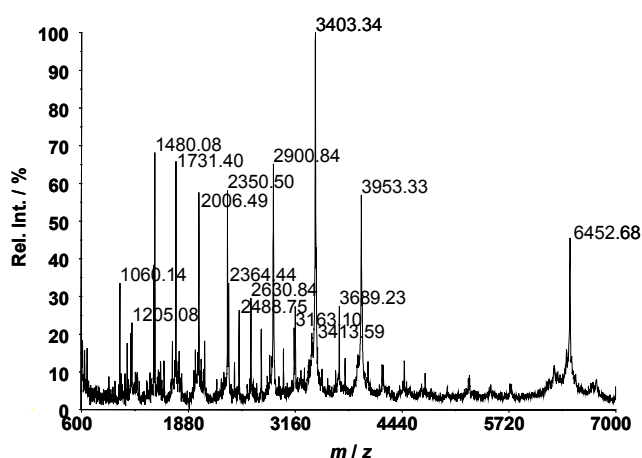


Überraschenderweise ergab die PyBOP-vermittelte Synthese von Ac-oootccttcccaactttgacaooooLPKTGGR-NH<sub>2</sub> (**11**) und verwandten Sequenzen Produkte mit Molmassen die  $67 \pm 4$  Da über den erwarteten lagen, wie die Analyse mittels Massenspektrometrie zeigte (Tabelle 3). Synthesen mit HATU ergaben dagegen die gewünschten Produkte (nicht gezeigt).

**Tabelle 3.** Berechnete und gefundene Molmassen der mit PyBOP synthetisierten PNAs.

Substanz	Struktur	[M+H] <sup>+</sup>	[M+H] <sup>+</sup>	Differenz
		ber.	gef.	
<b>11</b>	Ac-oootccttcccaactttgacaooooLPKTGGR-NH <sub>2</sub>	6389.41	6452.68	+63.3
<b>12</b>	H-oootccttctacctcagttacaooooLPKTGGR-NH <sub>2</sub>	6347.36	6412.93	+65.6
<b>13</b>	H-GGGootccttcccaactttgacaoooo-NH <sub>2</sub>	5808.68	5874.62	+65.9

Eine detaillierte Analyse der acetylierten Abbruchsequenzen mittels Massenspektrometrie zeigte, dass die Modifizierung an dem einzigen Guaninrest in der Sequenz auftrat und in Guanin-freien Sequenzen nicht beobachtet wurde (Abbildung 11 und Tabelle 4).

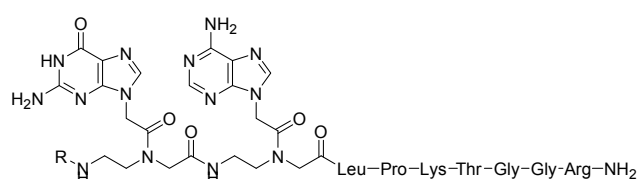


**Abbildung 11.** MALDI-Spektrum des Rohproduktes der 18mer PNA **11** mit Abbruchsequenzen.

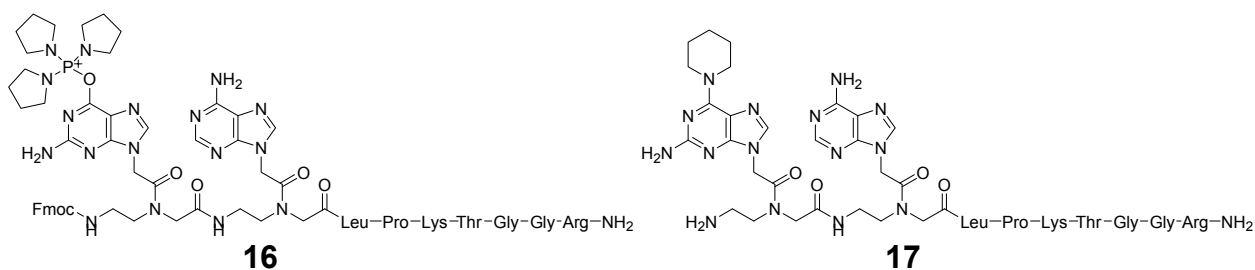
Um diese Nebenreaktion weiter aufzuklären, wurde ein kurzes Fragment, das Adenin und Guanin enthielt, mit HATU- bzw. PyBOP-Aktivierung synthetisiert und vom Harz mit bzw. ohne die N-terminale Fmoc-Gruppe abgespalten (Abbildung 12).

**Tabelle 4.** Berechnete und gefundene Massen der acetylierten Abbruchsequenzen im Rohprodukt von **11**.

Struktur	$[M+H]^+$ ber.	$[M+H]^+$ gef.	Differenz
Ac-ooctccttcccaactttgacaoooLPKTGGR-NH <sub>2</sub>	6389.41	6452.68	+63.3
Ac-actttgacaoooLPKTGGR-NH <sub>2</sub>	3623.70	3689.23	+65.5
Ac-tttgacaoooLPKTGGR-NH <sub>2</sub>	3097.19	3163.10	+65.9
Ac-ttgacaoooLPKTGGR-NH <sub>2</sub>	2830.94	2900.84	+69.9
Ac-tgacaoooLPKTGGR-NH <sub>2</sub>	2564.69	2630.83	+66.1
Ac-gacaoooLPKTGGR-NH <sub>2</sub>	2298.43	2364.44	+66.0
Ac-acaoooLPKTGGR-NH <sub>2</sub>	2007.17	2006.49	-0.7
Ac-caoooLPKTGGR-NH <sub>2</sub>	1731.90	1731.40	-0.5
Ac-aoooLPKTGGR-NH <sub>2</sub>	1480.66	1480.08	-0.6
Ac-oooLPKTGGR-NH <sub>2</sub>	1205.39	1205.08	-0.3
Ac-ooLPKTGGR-NH <sub>2</sub>	1060.23	1060.14	-0.1



**15:** R = H

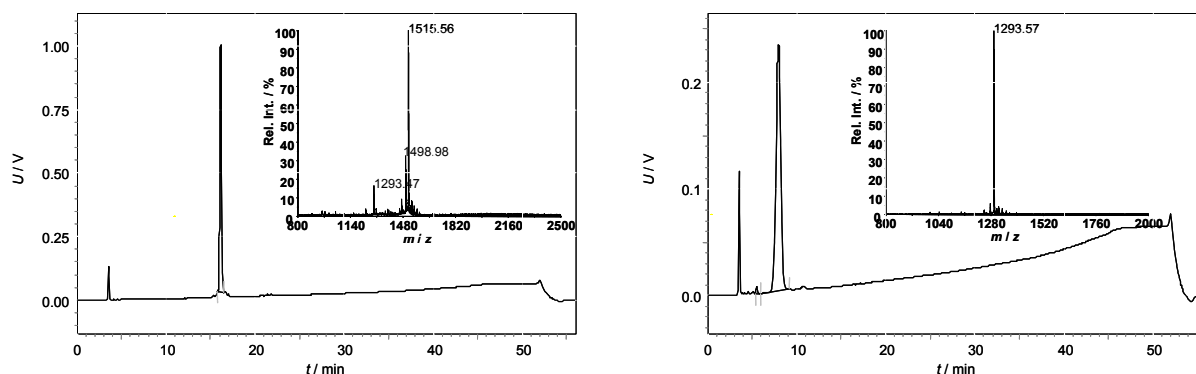
**Abbildung 12.** Erwartete PNA-Modellfragmente mit (**14**) bzw. ohne (**15**) Fmoc-Gruppe.**Abbildung 13.** Strukturen der modifizierten PNAs **16** und **17**.

Die Synthese mit HATU ergab in beiden Fällen die gewünschten Produkte mit Einzelpeaks in HPLC und MALDI-MS (Tabelle 5 und Abbildung 12). Bei der Synthese mit PyBOP wurde hingegen zusätzlich zum gewünschten Fmoc-geschützten Produkt **14** eine hydrophobere Verunreinigung (13% gemäß HPLC) mit einer höheren Masse (+239 Da) gefunden, die der Masse des O-Phosphonium modifizierten Produktes **16** entspricht (Tabelle 5 und Abbildung 13). Das Fmoc-entschützte Produkt **15** war ebenfalls mit einem hydrophoberen Nebenprodukt verunreinigt (18%), dessen Masse der der Piperidin modifizierten Verbindung **17** entspricht. Die Massendifferenz in diesem Produkt entspricht der erhöhten Masse, die bei den längeren PNAs (**11-13**) beobachtet wurde (siehe oben). In den Produkten, die mit PyBOP-Aktivierung erhalten wurden, waren Abbruchsequenzen nachweisbar, was auf unvollständige Kupplungen hindeutet.

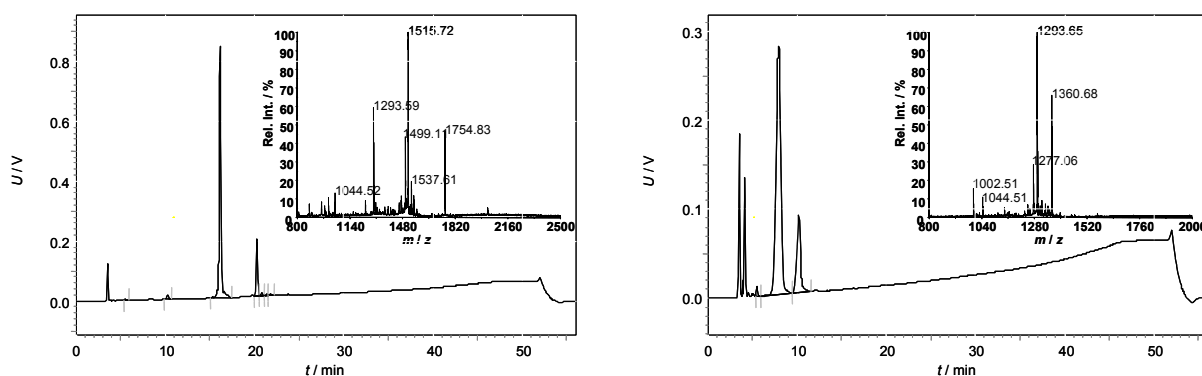
**Tabelle 5.** Analytische Daten für die unmodifizierten PNAs **14** und **15** und die modifizierten PNAs **16** und **17**.

Substanz	Aktivierungsreagenz	N-Terminus	[M] <sup>+</sup> ber.	[M+H] <sup>+</sup> gef.	(%) <sup>a</sup>
<b>14</b>	HATU	Fmoc-	1514.74	1515.56	>99
<b>15</b>	HATU	H-	1292.67	1293.57	>99
<b>14</b>	PyBOP	Fmoc-	1514.74	1515.70	83
<b>16</b>	PyBOP	Fmoc-	1754.90	1755.01 [M] <sup>+</sup>	13
<b>15</b>	PyBOP	H-	1292.67	1293.65	81
<b>17</b>	PyBOP	H-	1359.75	1360.88	18

<sup>a</sup> Anteil gemäß HPLC des Rohprodukts.

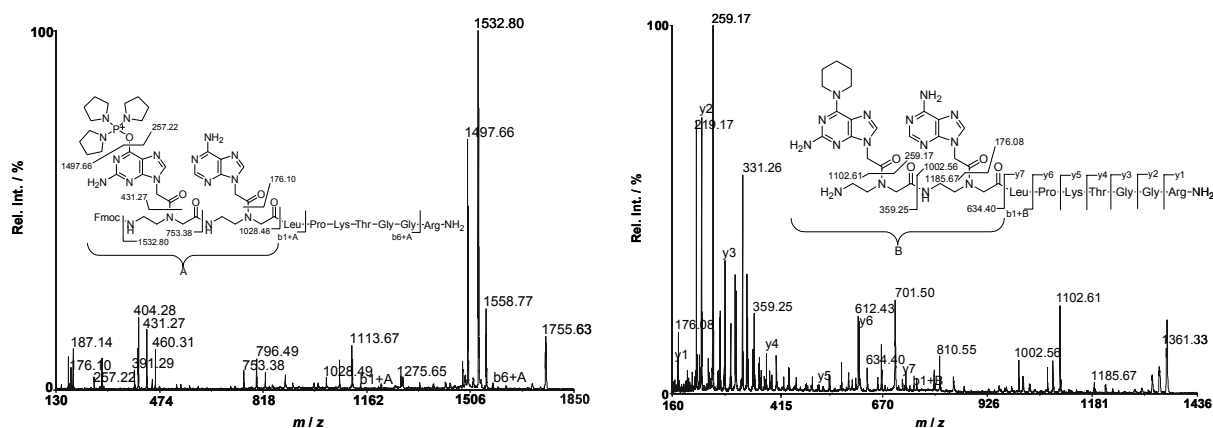


**Abbildung 14.** Synthese der PNA-Modellfragmente mit HATU: Abspaltung vom Harz mit (links) und ohne Fmoc-Gruppe (rechts).

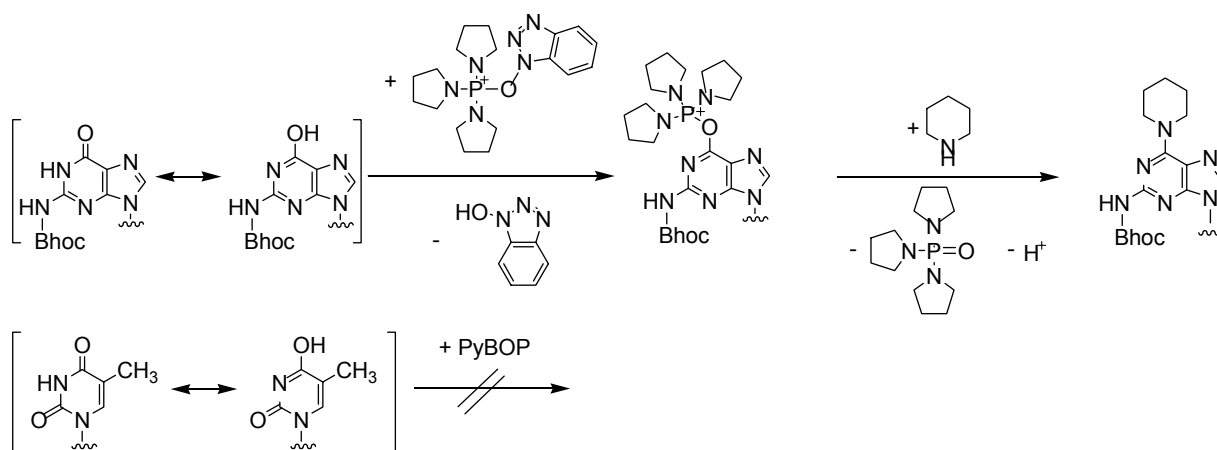


**Abbildung 15.** Synthese der PNA-Modellfragmente mit PyBOP: Abspaltung vom Harz mit (links) und ohne Fmoc-Gruppe (rechts).

Die Strukturen von **16** und **17** konnten mit MS/MS-Fragmentierung bestätigt werden. Hier wurden Fragmente gefunden, die deutlich zeigen, dass sich die Modifizierung an der Guaninbase befindet (Abbildung 16). Die Synthese der längeren PNAs (**11-13**) führte ausschließlich zu modifizierten Produkten, während bei den Modellfragmenten auch die erwarteten Produkte erhalten wurden. Dies führt zu dem Schluss, dass die Nebenreaktion auch während der nachfolgenden Kupplungsschritte nach der Einführung des Guanin enthaltenden PNA-Monomers stattfand.



Es wird der folgende Mechanismus für diese Nebenreaktion vorgeschlagen (Schema 15). Guanin besitzt eine enolisierbare Ketogruppe, die das Phosphoniumion des PyBOP-Reagenzes angreift und HOBT als Abgangsgruppe freisetzt. Die dadurch aktivierte Hydroxylgruppe wird durch das Nucleophil Piperidin substituiert, was zum stabilen Endprodukt führt. Warum diese Reaktion nicht mit Thyminresten – die ebenfalls enolisierbare Ketogruppen enthalten – auftritt, bleibt unklar. Wahrscheinlich verhindert die benachbarte Methylgruppe einen Angriff des sterisch anspruchsvollen Phosphoniumreagenzes.



Die hier als Nebenreaktion beschriebene Modifizierung findet als Werkzeug zur Synthese substituierter Guanine Anwendung. Wan *et al.* konnten nach dieser Methode eine Vielzahl ungesättigter Stickstoffheterocyclen durch Substitution einer Ketogruppe darstellen. Außerdem untersuchten sie den Einfluss verschiedener

Phosphoniumreagenzien im Hinblick auf diese Reaktion.<sup>[118]</sup> Verwendet wurden z. B. O<sup>6</sup>-Alkylguanine zur enzymvermittelten Fluoreszenzmarkierung von Fusionsproteinen.<sup>[119]</sup>

### 2.3.3. Synthese der Konjugate

Es sollte die Fähigkeit von verschiedenen zellpenetrierenden Peptiden, Peptidnucleinsäuren in den Zellkern zu schleusen, untersucht werden. Zur Quantifizierung der Internalisierung diente ein biologisches Modell: Der Eingriff der PNA in einen Spleißvorgang von prä-mRNA. Um Probleme bei der Reinigung – bedingt durch die mögliche Aggregation der Konjugate – zu verhindern, sollten diese aus gereinigten Edukten durch Sortase-vermittelte Ligation synthetisiert werden. Als Ausgangsstoffe wurden daher die folgenden Peptide und Peptidnucleinsäure-Oligomere synthetisiert und mittels HPLC und MS charakterisiert (Tabelle 6).

**Tabelle 6.** Sequenzen der für die Ligation verwendeten CPPs und PNAs

Name	Formel	Sequenz <sup>a</sup>	Strukturelle Eigenschaften <sup>b</sup> und Ladung
KLA	<b>18</b>	H-KLALKLALKALKAALKLALPKTGGR-NH <sub>2</sub>	amphipathisch, $\alpha$ -helikal,
	<b>19</b>	H-GGGKLALKLALKALKAALKLA-NH <sub>2</sub>	5+
ELA	<b>20</b>	H-ELALELALEALEAALELALPKTGGR-NH <sub>2</sub>	amphipathisch, $\alpha$ -helikal,
	<b>21</b>	H-GGGELALELALEALEAALELA-NH <sub>2</sub>	5-
KAL	<b>22</b>	H-KALKLKAALALLAKLKLALPKTGGR-NH <sub>2</sub>	nichtamphipathisch, $\alpha$ - helikal, 5+
KGL	<b>23</b>	H-KGLKLKGGLGLLGKLKLGLPKTGGR-NH <sub>2</sub>	unstrukturiert, 5+
RLA	<b>24</b>	H-RLALRLALRALRAALRLALPKTGGR-NH <sub>2</sub>	amphipathisch, $\alpha$ -helikal, 5+
Pen	<b>25</b>	H-RQIKIWFQNRRMKWKKLPKTGGR-NH <sub>2</sub>	amphipathisch, schwach
	<b>26</b>	H-GGGRQIKIWFQNRRMKWKK-NH <sub>2</sub>	$\alpha$ -helikal, 5+
PNA	<b>27</b>	Ac-ooocctcttacctcagttacaoooLPKTGGR-NH <sub>2</sub>	<i>Antisense</i> -Sequenzen
	<b>28</b>	H-GGGooocctcttacctcagttacaooo-NH <sub>2</sub>	
PNA	<b>29</b>	Ac-oootccttcccaactttgacaoooLPKTGGR-NH <sub>2</sub>	vertauschte Basenfolge ( <i>scrambled sequence</i> )
scr	<b>30</b>	H-GGGoootccttcccaactttgacaooo-NH <sub>2</sub>	
FAM- PNA	<b>31</b>	FAM-ooocctcttacctcagttacaoooLPKTGGR- NH <sub>2</sub> <sup>c</sup>	fluoreszenzmarkierte <i>Antisense</i> -Sequenz

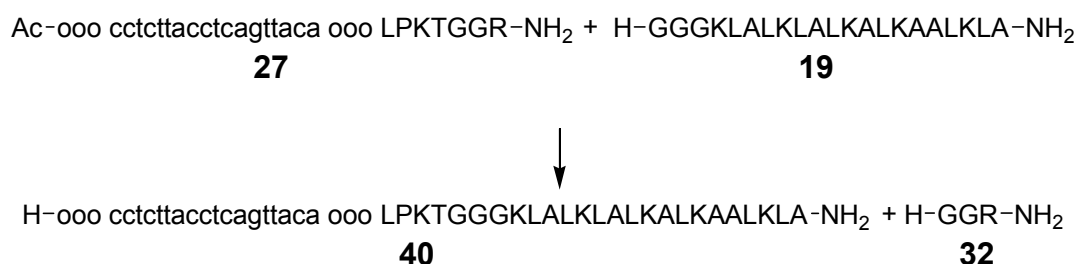
<sup>a</sup> Großbuchstaben: Aminosäuren, Kleinbuchstaben: PNA-Basen, o: Ethylenglykollinker;

<sup>b</sup> Gemäß CD-Messungen in 50% Trifluorethanol/Wasser<sup>[120]</sup>; <sup>c</sup> FAM = 5-Carboxyfluorescein.

Die Peptide unterschieden sich dabei in ihren Eigenschaften hinsichtlich Ladung, Helizität und Amphipathie, da diese Faktoren die Membrangängigkeit von Peptiden wesentlich beeinflussen.<sup>[101b]</sup> Für die Anknüpfung der PNAs wurde entweder an deren C-Terminus die optimierte Sortase-Erkennungssequenz LPKTGGR oder am N-Terminus ein Triglycylrest eingeführt. Dadurch sollte der Einfluss der Reihenfolge der Moleküle (Peptid C- oder N-terminal zur PNA) auf die Transporteigenschaften untersucht werden. Um die Löslichkeit der PNAs zu erhöhen und ihre Tendenz zur Aggregation zu vermindern, wurden die PNA-Reste von drei Ethylenglykollinkern (ooo) flankiert. Die für die Sortase-vermittelte Ligation nötigen Reste wurden, wie bei den Peptiden erläutert, eingeführt. Die 18mer PNA-Sequenz (**27/28/31**) zielte auf die abweichende Spleißstelle

des mutierten humanen  $\beta$ -Globinintrons 2, welches die codierende Sequenz eines Luziferase Reporter-Gens unterbricht.<sup>[121]</sup> Erreicht die PNA den Zellkern, bindet sie dort sequenzspezifisch an die prä-mRNA der Luziferase, wodurch der sonst unterdrückte Spleißvorgang wieder ablaufen kann und Luziferase translatiert wird. Die Zellen zeigen dann eine messbare Lumineszenz. Zum Beweis der Sequenzspezifität dieses Vorgangs wurden PNAs mit vertauschter Basenfolge synthetisiert (**29/30**). Die fluoreszenzmarkierte PNA (**31**) sollte zu Aufnahmeuntersuchungen mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie dienen.

Die Ligation der PNA **27** mit dem Peptid **19** unter den selben Bedingungen wie im optimierten Fall der Peptidbibliotheken gab überraschenderweise nur einen Umsatz von 38% (Schema 16). Dies zeigte einmal mehr, dass das Erkennungsmotiv wichtig ist, aber auch andere Eigenschaften der Ausgangsstoffe die Ausbeute bestimmen. Um eine Gleichgewichtsreaktion auf die Seite der Produkte zu verschieben, gibt es mehrere Möglichkeiten, wie z. B. die Verwendung eines Überschusses an billigerem Edukt oder die Entfernung eines Produktes aus dem Gleichgewicht. Die Abgangsgruppe **32** war im Vergleich zu den anderen Reaktanden klein und sollte daher einfach durch Dialyse entfernbar sein. In der Tat lief die Reaktion katalysiert von 2 mol% Sortase unter Dialysebedingungen mit Umsätzen von 61% bzw. 94% bei Stoffmengenverhältnissen von 1/1 bzw. 1/5 (**27/19**) ab. Das erhaltene Produkt ließ sich gut mittels semi-präparativer RP-HPLC abtrennen und war homogen gemäß analytischer HPLC und MS.<sup>[87]</sup> Nach dieser Methode wurden dann alle weiteren Ligationen durchgeführt (Tabelle 7). In keinem der Fälle wurden durch Proteolyse bedingte Nebenprodukte beobachtet.



**Schema 16.** Synthese des PNA–KLA-Konjugats **40**.



**Tabelle 7.** Die mittels Sortase-vermittelter Ligation synthetisierten CPP–PNA-Konjugate.

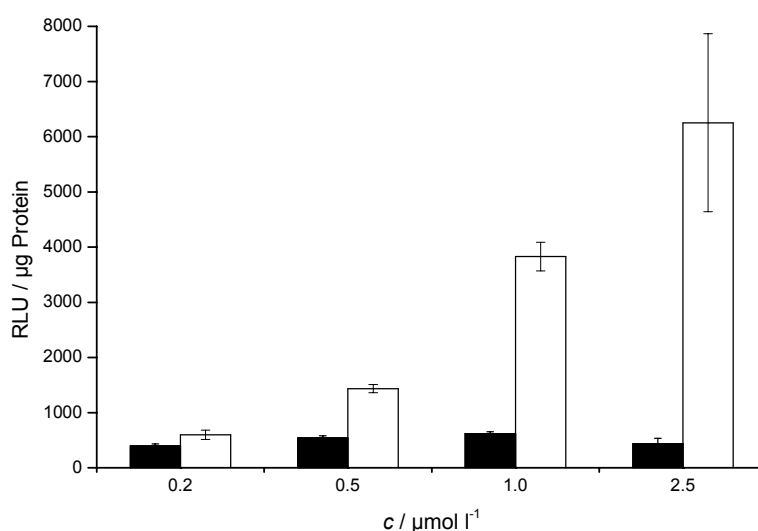
Formel	Name	Sequenz <sup>a</sup>	Kupplungs- ausbeute <sup>b</sup>
<b>33</b>	KLA-PNA	H-KLAL KLAL KAL KAAL KLA LPKTGGG 000 cct ctt acc tca gtt aca 000-NH <sub>2</sub>	47%
<b>34</b>	ELA-PNA	H-ELAL ELAL EAL EAAL ELA LPKTGGG 000 cct ctt acc tca gtt aca 000-NH <sub>2</sub>	56%
<b>35</b>	KAL-PNA	H-KALK LKAA LAL LAKL KLA LPKTGGG 000 cct ctt acc tca gtt aca 000-NH <sub>2</sub>	57%
<b>36</b>	KGL-PNA	H-KGLK LKGG LGL LGKL KLG LPKTGGG 000 cct ctt acc tca gtt aca 000-NH <sub>2</sub>	54%
<b>37</b>	RLA-PNA	H-RLAL RLAL RAL RAAL RLA LPKTGGG 000 cct ctt acc tca gtt aca 000-NH <sub>2</sub>	49%
<b>38</b>	Pen-PNA	H-RQI KIW FQN RRM KWKK LPKTGGG 000 cct ctt acc tca gtt aca 000-NH <sub>2</sub>	80%
<b>39</b>	KLA-PNA scr	H-KLAL KLAL KAL KAAL KLA LPKTGGG 000 tcc ttc cca act ttg aca 000-NH <sub>2</sub>	57%
<b>40</b>	PNA-KLA	Ac-000 cct ctt acc tca gtt aca 000 LPKTGGG KLAL KLAL KAL KAAL KLA-NH <sub>2</sub>	94%
<b>41</b>	PNA-ELA	Ac-000 cct ctt acc tca gtt aca 000 LPKTGGG ELAL ELAL EAL EAAL ELA-NH <sub>2</sub>	87%
<b>42</b>	PNA-Pen	Ac-000 cct ctt acc tca gtt aca 000 LPKTGGG RQI KIW FQN RRM KWKK-NH <sub>2</sub>	93%
<b>43</b>	PNA scr- KLA	Ac-000 tcc ttc cca act ttg aca 000 LPKTGGG KLAL KLAL KAL KAAL KLA-NH <sub>2</sub>	91%
<b>44</b>	FAM-PNA- KLA	FAM-000 cct ctt acc tca gtt aca 000 LPKTGGG KLAL KLAL KAL KAAL KLA-NH <sub>2</sub> <sup>c</sup>	85%
<b>45</b>	FAM-PNA- ELA	FAM-000 cct ctt acc tca gtt aca 000 LPKTGGG ELAL ELAL EAL EAAL ELA-NH <sub>2</sub> <sup>c</sup>	54%
<b>46</b>	FAM-PNA- Pen	FAM-000 cct ctt acc tca gtt aca 000 LPKTGGG RQI KIW FQN RRM KWKK-NH <sub>2</sub> <sup>c</sup>	92%

<sup>a</sup> Die Konjugate zeigten Reinheiten >99% (**36**, **37** >83%) und korrekte Massen in der MS;<sup>b</sup> Mittels HPLC bestimmt; <sup>c</sup> FAM = 5-Carboxyfluorescein.

Sämtliche Konjugate wurden in guten bis hervorragenden Ausbeuten gewonnen. Interessanterweise waren die Ausbeuten höher (um 90%), wenn sich die PNA am N-

Terminus des Konjugats befand. Gründe dafür sind nicht bekannt, jedoch könnte sich die unterschiedliche Struktur auf die Aggregationstendenz des Konjugats und/oder der PNA auswirken. Dies hätte eine unterschiedliche Erkennung durch Sortase zur Folge.

Es wurden Aufnahmeuntersuchungen mit den durch Sortase-vermittelte Ligation synthetisierten CPP–PNA-Konjugaten durchgeführt.<sup>[122]</sup> Dabei wurde unter anderem gezeigt, dass das Konjugat PNA-KLA (**40**) eine erhöhte Antisense-Aktivität im Vergleich zur PNA **27** besitzt. Außerdem wurde eine Konzentrationsabhängigkeit der Aktivität gefunden (Abbildung 17). Die Konjugate mit vertauschten Basen im PNA-Teil zeigten keine Aktivität, was die Sequenzspezifität des beobachteten Effekts unterstreicht (ohne Abbildung).



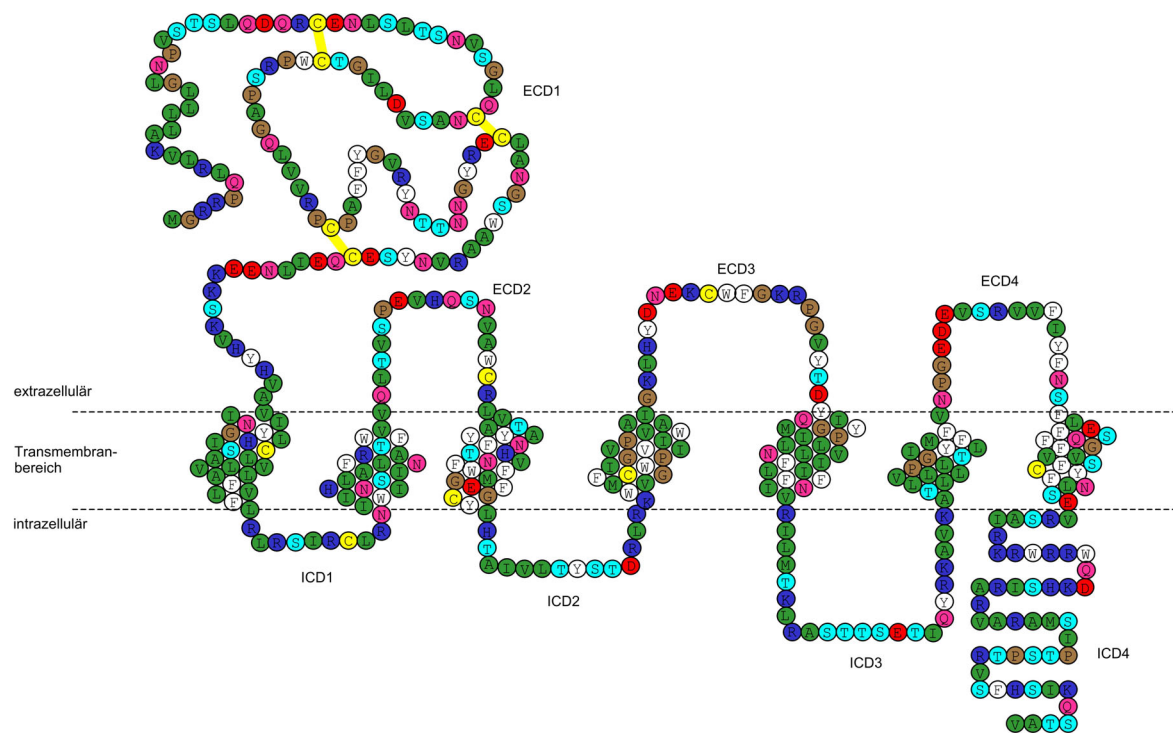
**Abbildung 17.** Konzentrationsabhängigkeit der Antisense-Aktivität des PNA-KLA-Konjugats **40**. Aktivität der PNA **27** (schwarze Balken) und des PNA–KLA-Konjugats **40** (weiße Balken) in relativen Lumineszenzeinheiten (RLU) pro  $\mu\text{g Protein}$ .

Es ist bekannt, dass verschiedene Verknüpfungsarten von CPP und PNA – wie Amid, Maleimid, Ester oder Disulfid – die Antisenseaktivität beeinflussen können.<sup>[123]</sup> Um einen Einfluss des LPKTGGG-Motivs und der Ethylenglykollinker auszuschließen, wurden daher auch Konjugate ohne diese beiden Strukturmerkmale am Harz synthetisiert und getestet. Dabei zeigte sich, dass sie keinen Effekt auf die biologische Aktivität besaßen.

## 2.4. Synthese eines künstlichen Rezeptor-Konstrukts<sup>[124]</sup>

### 2.4.1. Einleitung

Der Angriffspunkt eines Großteils der heutzutage verwendeten Arzneimittel sind G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCRs).<sup>[125]</sup> Vor allem auf Grund ihrer Größe und der Tatsache, dass sie nur in geringer Dichte in Membranen eingebettet vorliegen, sind GPCRs hochauflösenden strukturanalytischen Methoden gegenwärtig kaum zugänglich. Diese Proteine bestehen aus vier extrazellulären Domänen: dem N-Terminus (ECD1) und drei Loops (ECD2, 3, 4). Diese sind mit den vier intrazellulären Domänen (ICD1, 2, 3, 4) über sieben helikale transmembranäre Abschnitte verbunden (Abbildung 18). Für diese Art von Peptidrezeptoren wurde gezeigt, dass die extrazellulären Domänen für die Ligandbindung häufig von besonderer Bedeutung sind. Im Fall des Corticotropin-Releasing Factor Rezeptors, Subtyp 1 (CRF<sub>1</sub>), der zur Familie B1 der GPCRs gehört, wurde beispielsweise gezeigt, dass der N-Terminus die Hauptbindungsstelle für den Liganden darstellt, da ein löslicher, nicht-glykosylierter ECD1 bereits beträchtliche Affinität für den natürlichen Peptidagonisten Urocortin 1 und den peptidischen Antagonisten Astressin aufweist.<sup>[126]</sup> Bemerkenswert ist dabei, dass für diesen löslichen ECD1 vom CRF<sub>1</sub> für <sup>125</sup>I-markiertes Sauvagin,<sup>[127]</sup> einen anderen natürlichen Peptidagonisten mit einer dem Urocortin 1 vergleichbaren Affinität für den nativen CRF-Rezeptor,<sup>[128]</sup> keine Bindung gefunden wurde (Abbildung 19). Dieses Ergebnis lässt für diese beiden Agonisten eine unterschiedliche Beteiligung der extrazellulären Loops an der Rezeptorbindung vermuten. Um diese Frage zu untersuchen, sollte ein Konstrukt bestehend aus den vier extrazellulären Domänen des CRF<sub>1</sub>-Rezeptors – angeknüpft an ein Peptidtemplat – synthetisiert und dessen Bindungseigenschaften für Urocortin 1 und Sauvagin bestimmt werden (Abbildung 20). Da es keine experimentellen Daten zur Struktur von Rezeptoren der Klasse B gibt, wurden für dieses Rezeptormodell vorerst keine strukturellen Einschränkungen vorgesehen. Es wurde im Gegenteil Wert auf Flexibilität der Einzeldomänen gelegt in der Hoffnung, dass es eine Selbstorganisation der Domänen im Konstrukt durch spezifische Wechselwirkungen untereinander und vor allem in Gegenwart eines Peptidliganden geben könnte.



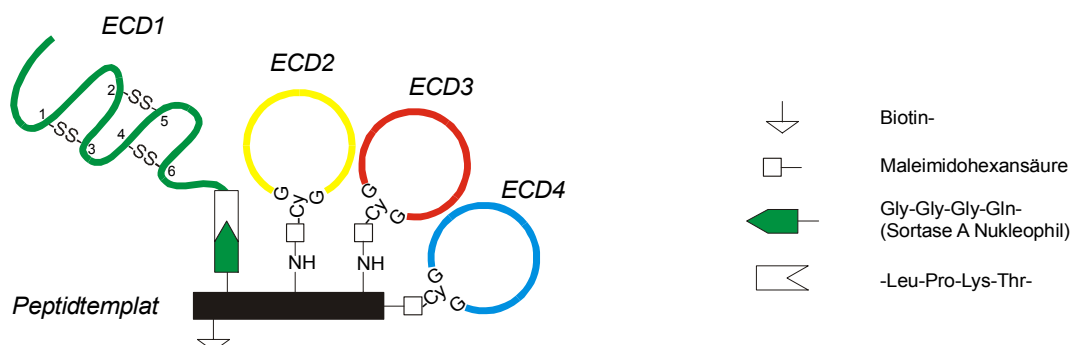
**Abbildung 18.** Der Corticotropin-Releasing Factor (CRF<sub>1</sub>) Rezeptor, ein G-Protein gekoppelter Rezeptor.

CRF (r/h):     SEEPPISLDLTFHLLREVLEMARAEQLAQQAHSNRKLMETI-NH<sub>2</sub>

Sauvagin:     ZGPPISIDLSLELLRKMIEIEKQEKEKQAANNRLLDTI-NH<sub>2</sub>

Urocortin 1:   DDPPLSIDLTFHLLRTLLELARTQSQRERAEQNRIIFDSV-NH<sub>2</sub>

**Abbildung 19.** Sequenzen natürlicher Peptidliganden des CRF<sub>1</sub>-Rezeptors (Z: *pyro*-Glutamin). Grau unterlegt sind im Vergleich zum CRF nicht übereinstimmende Sequenzabschnitte.



**Abbildung 20.** Schematischer Aufbau des CRF<sub>1</sub>-Rezeptormimetikums: Die drei Loops (ECD2 bis 4) sind mittels Thiol-Maleimidligation, der Rezeptor-N-Terminus (ECD1) ist mittels Sortase-vermittelter Ligation an ein flexibles Peptidtemplat geknüpft worden. Der enthaltene Biotinrest dient zur Fixierung an einem Avidin-beschichteten Träger.

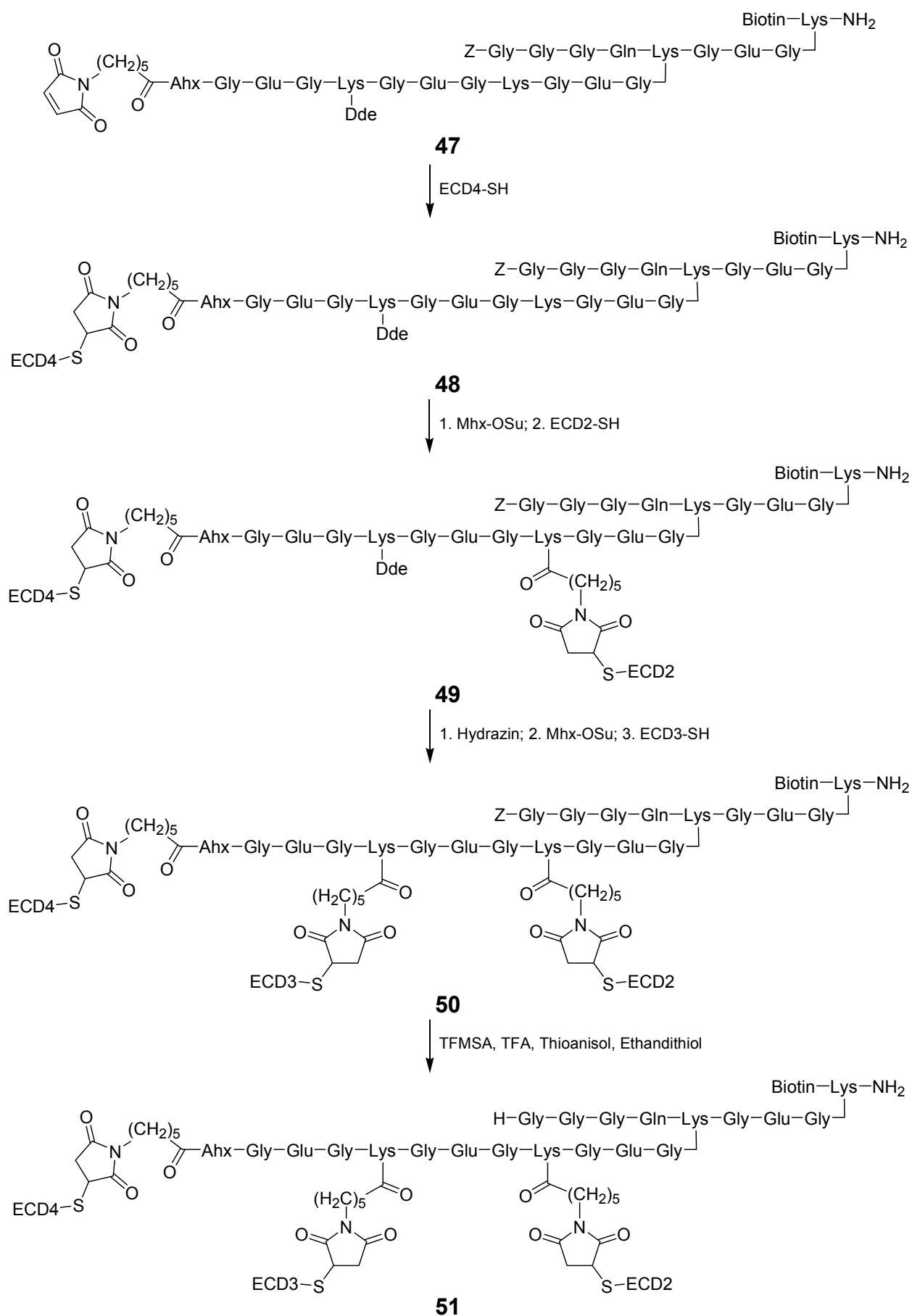
### 2.4.2. Synthese des 3-Loop-Konstrukts

Als Mimetikum für die drei extrazellulären Loop-Domänen ECD2, ECD3 und ECD4 wurden Cyclopeptide entsprechender Sequenz verwendet, um die Topologie des natürlichen Rezeptors nachzuahmen (Abbildung 21). Die zwei natürlich vorkommenden Cysteinreste in ECD2 und ECD3 des CRF<sub>1</sub>-Rezeptors wurden durch Alanin und Serin ersetzt. Es ist bekannt, dass dieser Austausch keinen Effekt auf die hochaffine Bindung von natürlichen Peptidliganden hat.<sup>[129]</sup> Die für die Ligation benötigten Thiolgruppen wurden in die linearen Sequenzen mittels eines zusätzlichen N-terminalen Cysteinrestes eingeführt. Dieser diente auch zur Cyclisierung mittels nativer chemischer Ligation mit dem C-terminalen Thiolester des dort eingeführten Glycinrestes. ECD2 bis 4 wurden mittels Standardmethoden an fester Phase synthetisiert, *via* NCL cyclisiert und chromatographisch gereinigt.

ECD2-SH: *cyclo*(CGVQLTVSPEVHQSNVAWSRLG)  
ECD3-SH: *cyclo*(CGIGKLHYDNEKSWFGKRPGVYTDYG)  
ECD4-SH: *cyclo*(CGVNPGEDEVS RVVFIYFNSFG)

**Abbildung 21.** Sequenzen der cyclischen extrazellulären Domänen ECD2, ECD3 und ECD4.

Das verwendete Peptidtemplat (**47**) bestand aus Glycin, Glutaminsäure und Lysin (Schema 17). Die Aminogruppen des Templats dienten als Verankerungspunkte für die Domänen und die Seitenketten der Glutaminsäure zur Verbesserung der Löslichkeit in wässrigen Systemen. Das zusätzlich enthaltene Biotin ermöglichte die Fixierung des Konstruktes an Avidin-beschichtetes Harz, um Bindungsstudien mittels Szintillations-Nachbarschafts-Assay (*scintillation proximity assay*, SPA)<sup>[127]</sup> durchzuführen. Die aufeinanderfolgende, regioselektive Anknüpfung der Einzeldomänen an das Peptidtemplat wurde durch orthogonal abspaltbare Aminoschutzgruppen (Z: Benzyloxycarbonyl; Dde: (4,4-Dimethyl-2,6-dioxocyclohexyliden)ethyl) erreicht – einerseits zur schrittweisen Einführung von Maleimidohexansäureresten, die für die Thiolligation mit den Loops verwendet wurden, und andererseits für die Sortase-vermittelte Ligation des Rezeptor-N-Terminus an die Triglycyl-Kette des Templats.



**Schema 17.** Synthese des 3-Loop-Konstrukts **51**.

Das Peptidtemplat (**47**) wurde durch Standard-SPPS synthetisiert. An den Lysinresten, die Verzweigungspunkte darstellen, wurde die  $\epsilon$ -Aminogruppe temporär mit Dde geschützt. Ebenso wurden die Maleimidogruppe zur Anknüpfung des ersten Loops (ECD4) und Biotin während der Templatsynthese eingeführt. Die Ligation der Loops an das Templat erfolgte in allen drei Fällen in basischem, wässrigen Puffer. Da ECD4 kein Lysin enthielt, wurde nach der Anknüpfung von ECD4 die einzige Aminogruppe des erhaltenen Konstrukts mit Maleimidohexansäure-*N*-hydroxysuccinimidester (Mhx-OSu) umgesetzt. Die erhaltene Maleimidogruppe wurde daraufhin für die Ligation mit ECD2 verwendet, welche wie ECD4 keinen Lysinrest enthielt. Die Abspaltung der Dde-Schutzgruppe des 2-Loop-Konstrukts **49** durch Behandlung mit Hydrazin gelang glatt nach vorheriger Neutralisierung mit Ammoniaklösung. Nach Umsetzung der so erhaltenen einzelnen Aminogruppe mit Mhx-OSu, wurde schließlich ECD3 mittels Thiolligation angeknüpft. Die nachfolgende Abspaltung der Z-Gruppe mit Trifluormethansulfonsäure lieferte schließlich das 10.5 kDa große 3-Loop-Konstrukt **51**, das für die enzymatische Ligation an den Rezeptor-N-Terminus eingesetzt wurde (Abbildung 23b).

#### 2.4.3. Expression und *in vitro* Faltung des Rezeptor-N-Terminus

Der N-Terminus des CRF<sub>1</sub>-Rezeptors (ECD1) wurde mit N-terminalem His<sub>6</sub>-Tag und C-terminaler Sortase-Erkennungssequenz (LPKTGGRR) in *E. coli* exprimiert und anschließend in einem Glutathion-Redoxsystem *in vitro* rückgefaltet.<sup>[127]</sup> Durch nachfolgende chromatographische Reinigung wurde das gefaltete Protein in einer Reinheit von über 95% erhalten (Abbildung 23a).

Durch die Expression mit zusätzlichem N-terminalem His<sub>6</sub>-Tag und C-terminalem Sortase-Erkennungsmotiv, wurde die Primärstruktur des Proteins verändert. Diese Eigenschaft ist aber bestimmend für die Faltung und damit auch für die Ausbildung der Cystinbrücken. Es ist demnach nicht zwingend, dass dieser CRF<sub>1</sub>-Rezeptor-N-Terminus genauso faltet wie im nativen Rezeptor. Deshalb wurde die Disulfidstruktur des gefalteten N-Terminus bestimmt und mit der verglichen, die für das native Protein angenommen wird.<sup>[127]</sup> Dazu wurde das gefaltete Protein enzymatisch verdaut und die erhaltenen Fragmente mittels LC-MS analysiert. Als Protease wurde Chymotrypsin verwendet, ein Enzym das C-terminal der hydrophoben Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin, Phenylalanin, Leucin und Methionin spaltet. Abbildung **22** zeigt die Primärsequenz des exprimierten CRF<sub>1</sub>-Rezeptor-N-Terminus mit den gefundenen

chymotryptischen Spaltstellen. In Tabelle 8 sind die identifizierten linearen Fragmente aufgelistet.

```

      MRGSHHHHHHGSLQDQRCENLSLTSNVSGLQCNASVDLIGTCWPRSPAGQLVVRPCPAFF
1  -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
      YGVRYNTTNGYRECLANGSWAARVNYSECQEILNEEKKSKVHYHVAVLPKTGGRR
61  -----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 116

```

**Abbildung 22.** Sequenz des N-Terminus des CRF<sub>1</sub>-Rezeptors mit N-terminalem His<sub>6</sub>-Tag und C-terminaler Sortase-Erkennungssequenz (ECD1-LPKTGGRR). Cysteinreste sind unterstrichen, beim Verdau mit Chymotrypsin gefundene Spaltstellen fett gekennzeichnet (die Spaltungen erfolgten C-terminal der markierten Aminosäure).

**Tabelle 8.** Gefundene lineare Fragmente nach Verdau des CRF<sub>1</sub>-Rezeptor-N-Terminus mittels Chymotrypsin.

Fragment	Sequenz	monoisotopische Masse ber.	monoisotopische Masse gef.	Abweichung in ppm
2-13	RGSHHHHHHGS <u>L</u>	1397.656	1397.645	-8
22-23	SL	218.127	218.128	6
22-30	SLTSNVSG <u>L</u>	876.455	876.455	-1
24-30	TSNVSG <u>L</u>	676.339	676.336	-4
61-64	YGVR	493.265	493.265	0
61-65	YGVR <u>Y</u>	656.328	656.325	-5
62-65	GVR <u>Y</u>	493.265	493.264	-2
66-72	NTTNG <u>Y</u>	782.320	782.318	-2
77-81	ANGSW	533.223	533.224	2
82-87	AARVNY	692.361	692.356	-7
95-104	NEEKKS <u>K</u> SVHY	1260.646	1260.644	-2
105-111	HVAVL <u>P</u> K	762.475	762.469	-8
105-116	HVAVL <u>P</u> KTGGRR	1289.768	1289.759	-7
112-116	TGGRR	545.303	545.301	-4

Sämtliche erwarteten Cystein-freien Fragmente, die größer als eine Aminosäure waren, konnten gefunden werden. Zusätzlich wurden einige Fragmente mit ausgelassener Spaltstelle (*missed cleavage*) identifiziert (z. B. Fragment 22-30). Das Protein wurde außerdem an zwei für Chymotrypsin untypischen Resten gespalten (Arg<sup>64</sup> und Lys<sup>111</sup>), was möglicherweise auf eine Verunreinigung des Enzyms mit Trypsin zurückzuführen ist. Es wurde kein lineares, Cystein enthaltendes Fragment gefunden. D. h., sämtliche Cysteine sind in Disulfidbrücken gebunden.



Zur Bestimmung des Disulfidmusters wurden die Massen aller theoretisch möglichen Kombinationen, inklusive der Homodimere, berechnet und die entsprechenden Massen in dem LC-MS Lauf gesucht. In Tabelle 9 sind die drei dabei identifizierten Disulfid-verbrückten Fragmente aufgeführt. Es wurde keines der anderen möglichen Fragmente gefunden. Das Disulfidmuster (C1-C3, C2-C5, C4-C6) stimmt mit dem anderer löslicher CRF<sub>1</sub>-Rezeptor-N-Termini überein.<sup>[127]</sup>

**Tabelle 9.** Gefundene Disulfid-verknüpfte Fragmente nach Verdau des CRF<sub>1</sub>-Rezeptor-N-Terminus mittels Chymotrypsin.

Fragment	Cysteinmuster	monoisotopische Abweichung		
		Masse ber.	Masse gef.	in ppm
14-21 und 39-51	Cys <sup>18</sup> -Cys <sup>42</sup> (C1-C3)	2387.111	2387.075	-15
31-38 und 73-76	Cys <sup>32</sup> -Cys <sup>75</sup> (C2-C5)	1365.601	1365.596	-4
52-59 und 88-94	Cys <sup>56</sup> -Cys <sup>90</sup> (C4-C6)	1705.816	1705.802	-9

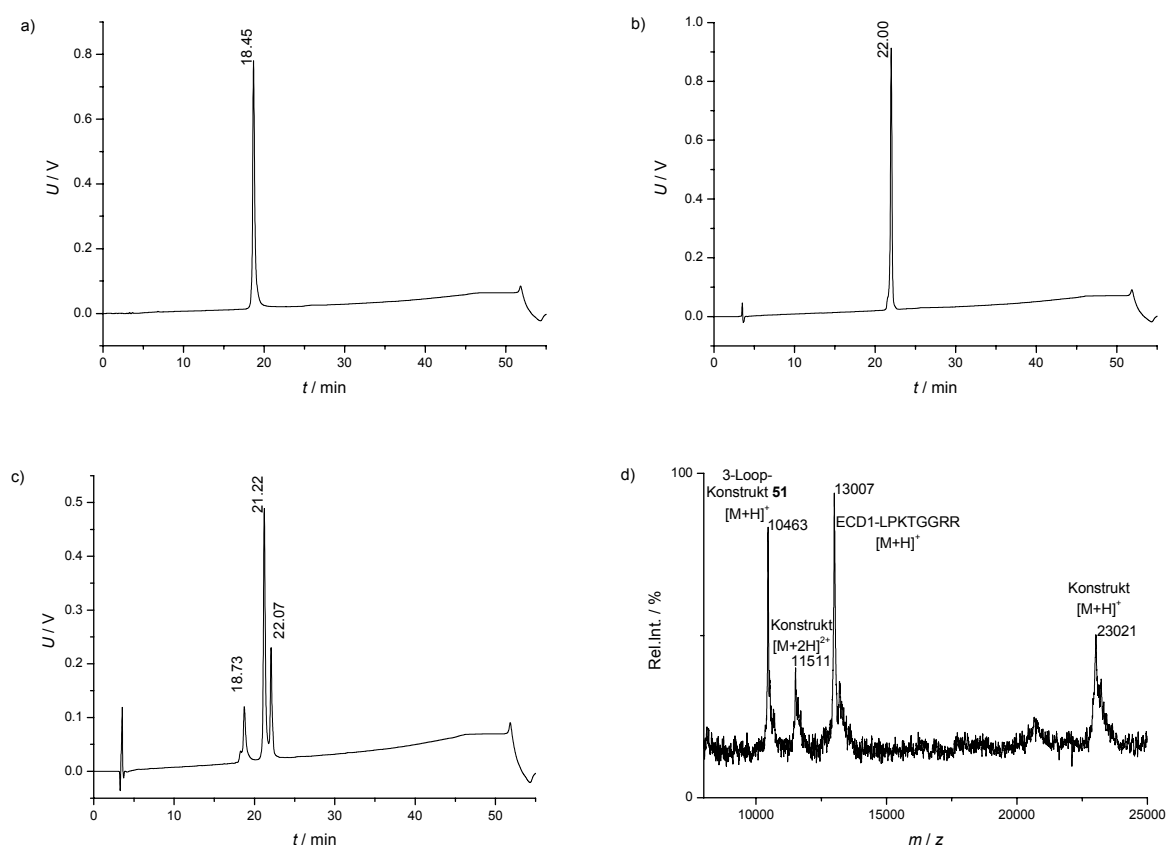
#### 2.4.4. Sortase-vermittelte Ligation von N-Terminus und 3-Loop-Konstrukt

Für die Verknüpfung von CRF<sub>1</sub>-Rezeptor-N-Terminus (ECD1-LPKTGGR) und dem 3-Loop-Konstrukt **51** wurde die Sortase-vermittelte Ligation als die am besten geeignete Methode betrachtet. Zum einen verläuft sie unter sehr milden Bedingungen, so dass keine reaktiven Gruppen chemo- und regioselektiv in das Protein eingeführt werden müssen. Außerdem wird die Disulfidstruktur des gefalteten ECD1-LPKTGGR nicht durch die Anwendung von Thiolen gestört. Zum anderen ist sie orthogonal zu der Maleimid-Thiolligation, die bei der Anknüpfung der drei extrazellulären Loops an das Templat Verwendung fand.

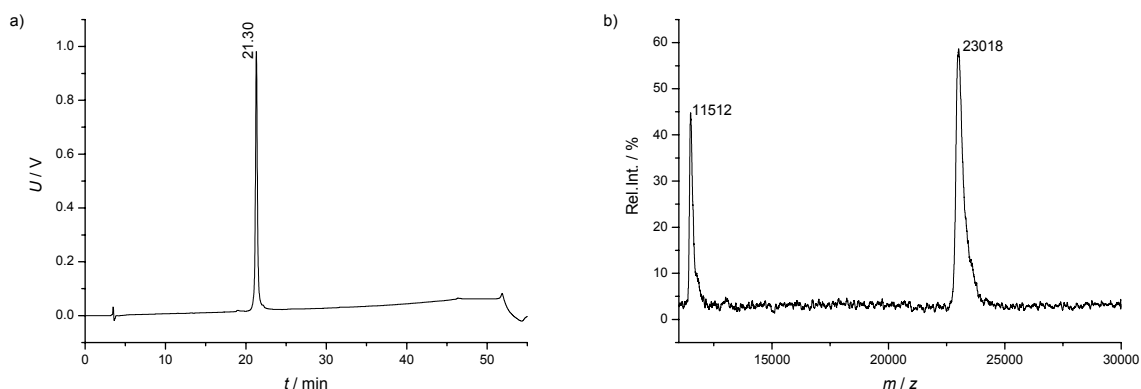
Jedoch wurde in diesem Fall die Anwendbarkeit der Sortase-vermittelten Ligation durch die Schwerlöslichkeit des 3-Loop-Konstrukts in dem verwendeten wässrigen Puffer eingeschränkt. Auch das entstehende Produkt erwies sich in diesem System als schwer löslich, so dass beide Proteine bei Zugabe der Sortase zu der Reaktionsmischung teilweise präzipitierten. Die Zugabe von 20% DMSO zum Lösungsmittel führte nur zu einer geringfügigen Verbesserung, aber die Verwendung von Harnstoff (0.95 mol l<sup>-1</sup>) führte dazu, dass alle Reaktanden in Lösung blieben. Bei der Reaktion von ECD1-LPKTGGR mit **51** im Verhältnis 1/1 – katalysiert durch 2.4 mol% Sortase A – wurde innerhalb von zwei Tagen eine Kupplungsausbeute von ca. 60% erreicht (Abbildung 23c und d). Die Anwendung von Dialyse während der Reaktion – wie bei den PNA-CPP-Konjugaten – führte in diesem Fall zur Präzipitation des Produktes an der

Dialysemembran verbunden mit Ausbeuteverlusten. Offenbar wirkte die Membran hier als eine Art Kristallisationskeim. Von der weiteren Anwendung von Dialyseverfahren bei dieser Ligation wurde deshalb abgesehen.

Schwierigkeiten bereitete zunächst auch die Reinigung des Produktes. Weder Gelchromatographie noch Chromatographie an PolyEncap RP-HPLC Säulen resultierten in einer hinreichenden Abtrennung des Produktes von dem nicht umgesetzten 3-Loop-Konstrukt **51**. Erst die Verwendung einer ProntoSIL RP-HPLC C-18 Säule führte hier zum Erfolg in Form des in hoher Reinheit erhaltenen ca. 23 kDa großen Produktes (Abbildung 24). Offenbar ist die stationäre Phase der ProntoSIL Säulen (konventionelle C-18 Phase) geeigneter als die durch Polyacrylsäureester modifizierte RP-Phase der PolyEncap Säulen, um das Produkt von den nicht umgesetzten Ausgangsstoffen abzutrennen.



**Abbildung 23.** Sortase-vermittelte Ligation: HPLC-Spuren a) des gefalteten N-Terminus des Rezeptors (ECD1-LPKTGGR), b) des 3-Loop-Konstrukts **51**, c) des Ligationsansatzes nach 2 d; d) MALDI-MS Spektrum des Ligationsansatzes nach 2 d.



**Abbildung 24.** Analytische Charakterisierung des Rezeptormimetikums bestehend aus den vier extrazellulären Domänen des Corticotropin-releasing Factor Rezeptors Typ 1: a) HPLC-Spur (220 nm); b) MALDI-MS Daten,  $[M+H]^+$  ber. 23023.6, gef.  $23018 \pm 10$ ,  $[M+2H]^{2+}$  ber. 11512.3, gef.  $11512 \pm 10$ .

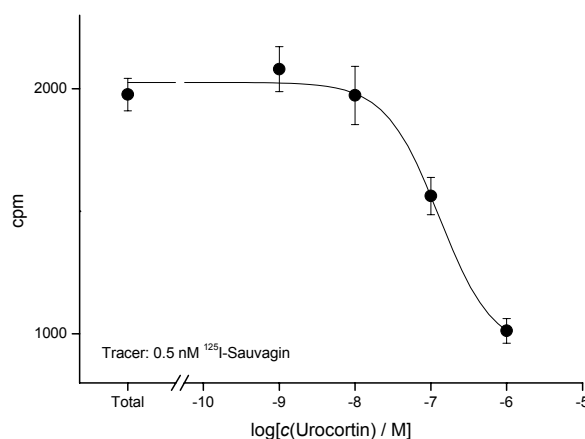
Die demonstrierte Kombination von rekombinanten, enzymatischen und chemischen Synthesemethoden eröffnet den Zugang zu einer neuen Generation von Proteinmodellen mit nicht-linearer Rückgratarchitektur. Das von Mutter *et al.* eingeführte TASP-Konzept,<sup>[28]</sup> dem er auch für die Synthese eines Konstruktes, bestehend aus drei Rezeptorloops, gefolgt ist,<sup>[130]</sup> konnte dadurch wesentlich erweitert werden. Die Verwendung von orthogonalen Schutzgruppenstrategien und modernen chemischen Ligationstechniken ermöglicht den Aufbau komplexer Proteinstrukturen. Unter Verwendung von NCL und Thiol-Maleimidligation kann die Synthese und schrittweise Verknüpfung von gereinigten, auch cyclischen Peptiden problemlos in wässrigen Systemen erfolgen. Besonders bemerkenswert sind die Möglichkeiten, die sich aus der Anwendung spezifischer Transpeptidasen wie der Sortase A ergeben, die nicht nur eine sehr große Sequenzspezifität besitzt, sondern auch keine unerwünschte Proteolyse induziert. Aufgrund der milden Reaktionsbedingungen können solche Enzyme zum Einbau sehr labiler Systeme, wie hier Disulfid-haltiger, aber darüber hinaus auch glykosylierter oder sulfatierter Strukturen eingesetzt werden, was die Möglichkeiten für die Proteinsynthese und damit für die Aufklärung von Struktur-Funktionsbeziehungen von Proteinen wesentlich erweitern kann.

#### 2.4.5. Bindungsuntersuchungen am Rezeptor-Konstrukt

Bindungsuntersuchungen am Rezeptor-Konstrukt wurden mittels SPA durchgeführt.<sup>[127]</sup> Dazu wurden verschiedene Konzentrationen Urocortin 1 mit radioaktiv markiertem  $^{125}\text{I}$ -Sauvagin und dem Rezeptormimetikum in Lösung inkubiert. Nach Bindung an Avidin-

beschichtetes SPA-Harz konnte die Aktivität des gebundenen radioaktiven Materials bestimmt werden.

Bemerkenswert war, dass unser Rezeptormimetikum im Gegensatz zum N-Terminus des Rezeptors<sup>[127]</sup> nicht nur Urocortin 1, sondern auch Sauvagin band. <sup>125</sup>I-Sauvagin konnte deshalb für das Mimetikum im Gegensatz zum N-Terminus als Tracer (0.5 nM) verwendet werden, und Urocortin 1 zeigte hier ebenfalls eine hoch affine Bindung (Abbildung 25). Obwohl das 3-Loop-Konstrukt ohne den N-Terminus keine Bindung für die beiden Liganden zeigte (ohne Abbildung), bewirkten die Loops im Zusammenspiel mit dem N-Terminus im Rezeptormimetikum eine hoch affine Bindung für Sauvagin. Dagegen wurde die Affinität für Urocortin 1 im Vergleich mit der zum N-Terminus ( $K_d$ : ~130 nM<sup>[127]</sup>) nur unwesentlich beeinflusst.



**Abbildung 25.** Bindung von Urocortin 1 an das Rezeptormimetikum für CRF<sub>1</sub>.

Die Affinität von Urocortin 1 für CRF<sub>1</sub> im ungekoppelten Zustand (stabil exprimiert in HEK293-Zellen;  $K_d$ : ~4 nM<sup>[131]</sup>) wurde für dieses erste Rezeptormimetikum erwartungsgemäß nicht erreicht (Urocortin 1;  $K_d$ : ~70 nM), aber das Ergebnis lieferte einen interessanten Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen zum Einfluss einer veränderten Topologie. So könnte die Stabilisierung der Struktur des Konstrukts – z. B. durch Verwendung eines cyclischen Templates – Einfluss auf die Ligandbindungseigenschaften des Mimetikums besitzen. Darüber hinaus können derartige GPCR-Mimetika wegen ihrer geringen Größe im Vergleich zum nativen Rezeptor für strukturanalytische Untersuchungen, wie Röntgenstrukturanalyse oder NMR, zum Mechanismus der Ligandbindung interessant sein. Aufgrund ihrer Löslichkeit in wässrigen Systemen können sie Untersuchungen ermöglichen, die mit Membran-

---

gebundenen Proteinen nicht durchführbar sind, wie z. B. das Auffinden neuer Liganden durch „fischen“ in Substanzbibliotheken.

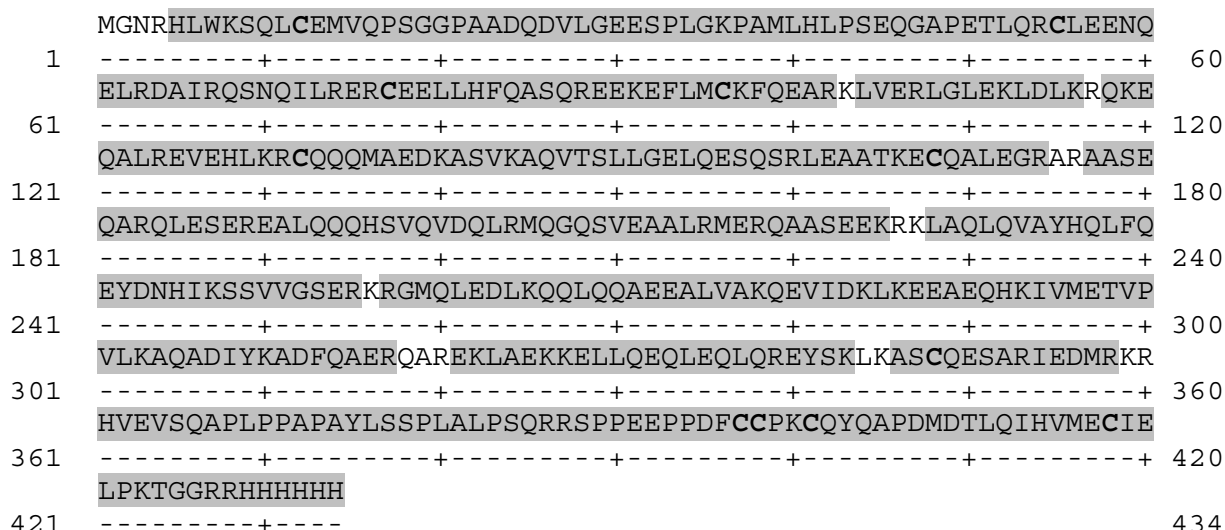
## 2.5. C-terminale Fluoreszenzmarkierung von Proteinen

Die Markierung von Proteinen ist ein wichtiges Werkzeug in der Proteinbiochemie. So wurden z. B. Rab-Proteine C-terminal mittels EPL mit Dansyl markiert, um Interaktionspartner aufzufinden.<sup>[132]</sup> Durch die hohe Spezifität sollte Sortase A ein geeignetes Werkzeug zur C-terminalen Markierung von Proteinen darstellen. Um diese Möglichkeit zu testen, sollten exprimierte Proteine, die C-terminal ein LPXTG-Motiv aufwiesen, mit einem Dansylrest fluoreszenzmarkiert werden. Als Nucleophil wurde ein Dansylmarkiertes Triglycyl-Peptid verwendet (H-Gly-Gly-Gly-Lys(Dns)-NH<sub>2</sub>, **52**).

Als Beweis der Realisierbarkeit einer solchen Reaktion wurde zuerst der N-Terminus des CRF<sub>1</sub>-Rezeptors (ECD1-LPKTGGR) mittels Sortase-vermittelter Ligation dansyliert. Dazu wurde das Protein mit dem dansylierten Peptid **52** im Verhältnis 1/1 und Sortase A (2 mol%) umgesetzt. Nach 42 h wurde mittels HPLC ein Umsatz von 59% ermittelt.

Als ein anspruchsvolleres Beispiel wurde das 50 kDa große Protein NEMO (NF- $\kappa$ B *essential modulator*) ausgewählt.<sup>[133]</sup> Dieses spielt eine wichtige Rolle im NF- $\kappa$ B (*nuclear factor-kappa B*) Signaltransduktionsweg, der unter anderem durch Aktivierung eines I $\kappa$ B Kinasekomplexes (IKK) reguliert wird. Dieser Komplex besteht aus drei Proteinen IKK $\alpha$ , IKK $\beta$  und IKK $\gamma$ , wobei die beiden katalytischen Kinaseuntereinheiten  $\alpha$  und  $\beta$  an die regulatorische Untereinheit  $\gamma$  gebunden sind. Daher wird IKK $\gamma$  auch NF- $\kappa$ B *essential modulator* oder kurz NEMO genannt.

Das Protein wurde mit einem C-terminalen LPKTGGRRH<sub>6</sub>-Motiv in *E. coli* exprimiert. Die Sequenz konnte durch LC-MS der tryptischen Fragmente bestätigt werden. Dabei wurde eine Sequenzabdeckung von 96% erreicht (Abbildung 26).



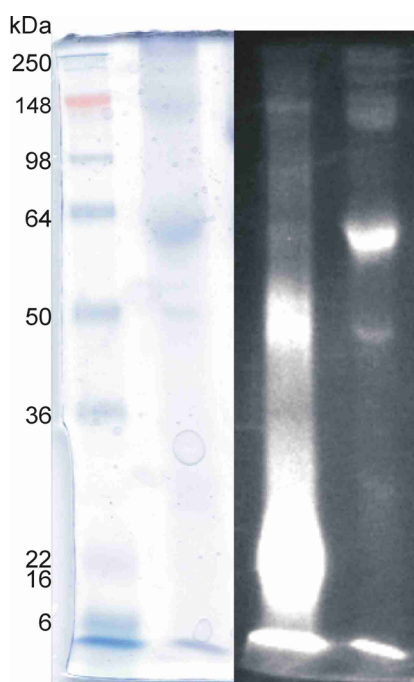
**Abbildung 26.** Sequenz von NEMO ( $49944 \text{ g mol}^{-1}$ ). Die beim tryptischen Verdau gefundenen Fragmente sind grau unterlegt, Cysteinreste sind fett gekennzeichnet.

Obwohl NEMO elf Cysteinreste besitzt und man daher annehmen kann, dass eine Disulfidstruktur vorliegt, gibt es in der Literatur dazu erstaunlich wenig Hinweise.<sup>[134]</sup> Zu diesem Zweck wurden verschiedene NEMO-Präparationen tryptisch verdaut und analog zum  $\text{CRF}_1$ -Rezeptor-N-Terminus mittels LC-MS auf Disulfid-verbrückte Fragmente untersucht. Dabei zeigte sich, dass bei keiner der verwendeten Arten zur Aufarbeitung von NEMO (ohne Rückfaltung, Rückfaltung im Glutathion-Redoxsystem in An- oder Abwesenheit von Zink) eine einheitliche Disulfidstruktur erhalten wurde (ohne Abbildung). Für diese Untersuchungen wurden freie Thiolgruppen vor dem enzymatischen Verdau mit Iodacetamid alkyliert, um einen Thiol/Disulfid-Austausch zu verhindern.

Eine Schwierigkeit bei der Ligation von NEMO lag in dessen Schwerlöslichkeit begründet. Dieses Protein präzipitierte in mikromolaren Konzentrationen aus physiologischem Puffer. Daher wurde die Sortase-vermittelte Ligation unter Zusatz von löslichkeitsvermittelndem Harnstoff durchgeführt. So wurden das Protein mit einem sechsfachen Überschuss an Dansylpeptid **52** und katalytischer Mengen Sortase A (7 mol%) in Harnstoff enthaltendem Puffer ( $1 \text{ mol l}^{-1}$ ) zum markierten Protein umgesetzt. Da bekannt war, dass große Substrate die Ligation verlangsamen,<sup>[84]</sup> wurde hier mit einem größeren Anteil Sortase gearbeitet.

Weder die Hydrophobizitäten noch die Molmassen von markiertem (49226 Da) und unmarkiertem (49944 Da) NEMO unterscheiden sich wesentlich. Dadurch waren die Retentionszeiten beider Moleküle in der Gelchromatographie und der RP-HPLC

ununterscheidbar. Darüber hinaus sind beide Moleküle in der Massenspektrometrie schlecht ionisierbar, weshalb mit dieser Methode aufgrund von zu kleinen Signalintensitäten ebenfalls keine analytischen Daten erhalten wurden. Die Abtrennung Hexahistidin-haltiger Reaktanden – das sind nicht umgesetzter Ausgangsstoff, die Abgangsgruppe und Sortase – erfolgte deshalb durch Filtration über IMAC, wo diese Stoffe gebunden blieben. Anschließende Dialyse diente der Entfernung überschüssigen Dansylpeptids. Insgesamt wurde eine Ausbeute von 34% an dansyliertem Protein isoliert, welches mit SDS-PAGE mit Fluoreszenzdetektion charakterisiert wurde (Abbildung 27).



**Abbildung 27.** SDS-PAGE von Dansyl-markiertem NEMO: Anfärbung mit Coomassie (links), Fluoreszenzdetektion (rechts; aufgenommen mit Lumi-Imager F1, Boehringer Mannheim,  $\lambda_{\text{ex}} = 345 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$ ).

Bei einem tryptischen Verdau des markierten Proteins wurde das dansylierte Fragment (TGGGK(Dns)-NH<sub>2</sub>) eindeutig identifiziert (Tabelle 10). Tryptische Fragmente der Abgangsgruppe des Substrats (GGRRHHHHHH) wurden nicht gefunden. D. h., bei dem isolierten Produkt handelt es sich um das erwartete dansylierte NEMO, welches keinen Ausgangsstoff als Verunreinigung enthält.



**Tabelle 10.** Gefundenes, dansyliertes, C-terminales Fragment von NEMO nach tryptischem Verdau.

TGGGK(Dns)-NH <sub>2</sub>	monoisotopische Masse ber.	monoisotopische Masse gef.	Abweichung in ppm
[M+H] <sup>+</sup>	651.292	651.290	-3
[M+2H] <sup>2+</sup>	326.150	326.149	-3
M	650.284	650.282	-3

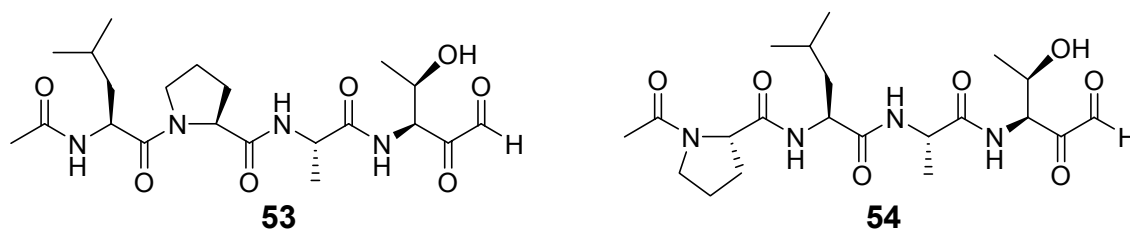
Somit konnte gezeigt werden, dass sich die Sortase-vermittelte Ligation zur selektiven C-terminalen Markierung von Proteinen eignet. Es sind auch doppelt markierte Proteine vorstellbar. Gleichzeitige Anknüpfung eines Affinitätsmarkers (z. B. Biotin) und eines Fluoreszenzmarkers würde in Konstrukten resultieren, die z. B. im Komplex mit Bindungspartnern nicht nur aus einer Mischung isolierbar, sondern mittels Fluoreszenzmessungen auch quantifizierbar wären.

In einem ähnlichen Ansatz wie in dieser Arbeit zeigten Popp *et al.* die Anwendbarkeit der Sortase-vermittelten Ligation für die selektive Markierung von Proteinen mit verschiedenen synthetischen Sonden wie Biotin, photospaltbaren Linkern, Photocrosslinkern oder verschiedenen Fluorophoren.<sup>[135]</sup>

## 2.6. Untersuchungen von Sortase-Inhibitoren

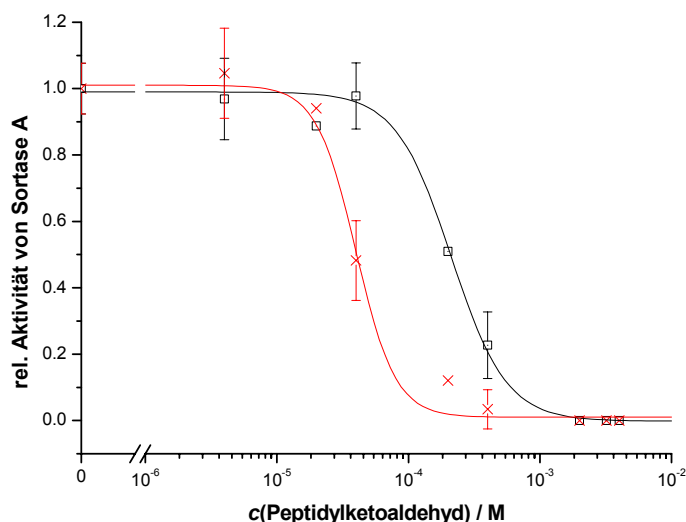
Aufgrund der zunehmenden Resistenz gegen Antibiotika sind bakterielle Proteasen und somit auch Sortase als viel versprechende Ziele für neue Therapieansätze einzuschätzen.<sup>[61]</sup> Die Entwicklung eines einfachen, HPLC-basierten Sortase-Aktivitätsassays (siehe Abschnitt 2.2.3) legte es nahe, diesen Assay auch zur Testung potentieller Inhibitoren dieses bakteriellen Enzyms zu nutzen.

Von Peptidylketoaldehyden ist bekannt, dass sie Inhibitoren sowohl für Serin- als auch für Cysteinproteasen darstellen.<sup>[136]</sup> In der Arbeitsgruppe Medizinische Chemie unseres Institutes wurde eine Methode für die Festphasensynthese von Peptidylketoaldehyden entwickelt.<sup>[137]</sup> Zwei entsprechende Moleküle wurden synthetisiert und chromatographisch gereinigt (A. El-Dahshan; Abbildung 28). Verbindung **53** bestand aus den ersten vier Resten der Sortase-Erkennungssequenz gefolgt von der 1,2-Diketofunktion anstelle der zu spaltenden Amidbindung zum Glycin. Zur Testung der Spezifität der Sequenz diente Peptid **54** mit vertauschtem Leucin- und Prolinrest.



**Abbildung 28.** Untersuchte Peptidylketoaldehyde: Ac-LPAT-CHO (links) und Ac-PLAT-CHO (rechts).

Die Aktivität der Sortase wurde bei verschiedenen Konzentrationen von Peptidylketoaldehyd mittels der in Abschnitt 2.2.3 beschriebenen Methode bestimmt und auf die Aktivität ohne Inhibitor bezogen (Abbildung 29).



**Abbildung 29.** Relative Aktivität von Sortase A in Anwesenheit der Peptidylketoaldehyde **53** (schwarze Kästchen) und **54** (rote Kreuze).

Es ist deutlich zu sehen, dass die beiden Substanzen Sortase im mikromolaren Bereich inhibierten. Eine Analyse der Daten ergab folgende  $IC_{50}$ -Werte:  $IC_{50}(\mathbf{53}) = (211 \pm 21) \mu\text{mol l}^{-1}$ ;  $IC_{50}(\mathbf{54}) = (40 \pm 4) \mu\text{mol l}^{-1}$ . Überraschenderweise inhibierte der Ketoaldehyd mit den vertauschten Aminosäuren um den Faktor fünf besser als die an das natürliche Substrat angelehnte Sequenz. Es ist zu vermuten, dass die inhibitorische Wirkung nur wenig vom Peptidteil, aber hauptsächlich durch die 1,2-Diketogruppe bestimmt wird.

Abbildung 29 zeigt, dass der hier beschriebene HPLC-Assay zur Charakterisierung potentieller Sortase-Inhibitoren gut geeignet ist. Aus Sicht der Medizinischen Chemie muss in weiterführenden Studien versucht werden, günstigere Leitstrukturen für Inhibitoren aus der inzwischen publizierte Röntgenstruktur der Sortase A<sup>[81]</sup> abzuleiten, z. B. durch computerbasierte Methoden wie *Molecular Modeling*. Allerdings hat auch international die Suche nach Inhibitoren für Sortase A noch keine überzeugenden Ergebnisse hervorgebracht. So wurden zwar peptidische Inhibitoren mit reaktiven Gruppen wie Diazomethan oder Chlormethyl synthetisiert und getestet,<sup>[74,75]</sup> jedoch wurde in keinem der vorgenannten Fälle ein Kontrollversuch mit geänderter Aminosäuresequenz (*scrambled sequence*) durchgeführt, der die Spezifität des entsprechenden Inhibitors zeigen würde.

## 2.7. Zusammenfassung und Ausblick

Peptide und Proteine sind wichtige Untersuchungsobjekte der biochemischen Forschung. Proteine, die durch rekombinante Expression in biologischen Systemen erhalten werden können, sind mit chemischen Methoden nur schwierig selektiv modifizierbar. Die Festphasenpeptidsynthese gestattet den Aufbau von 40-60mer Peptiden, ist aber nicht zur Synthese von Proteinen geeignet. Daher wurden in den letzten Jahren eine Reihe von chemischen Ligationsmethoden entwickelt, um weitgehend entschützte, gereinigte Peptidsequenzen im wässrigen Milieu zu koppeln. Die Verknüpfung kann dabei über native Amidgruppen (NCL, Staudinger-Ligation) oder über andere Bindungstypen (z. B. Oxime, Hydrazone, Thioether, etc.) erfolgen. Durch die Kombination mit molekularbiologischen Techniken können auch Proteine mit höheren Molmassen dargestellt bzw. in gewünschten Positionen oder Domänen modifiziert werden (EPL). Eine bedeutende methodische Erweiterung der Ligationsreaktionen gelang durch die Ausnutzung enzymkatalysierter Verknüpfungen (Subtiligase, Trypsin, Chymotrypsin) von Peptidsequenzen, deren Einsatz durch geringe Substratspezifität und proteolytische Aktivität begrenzt sein kann. Vor diesem Hintergrund von besonderem Interesse für einen möglichen Einsatz bei Ligationen ist die bakterielle Transpeptidase Sortase A. Dieses Enzym ist *in vivo* an der Anknüpfung von Proteinen an das bakterielle Peptidoglycan beteiligt, wobei es Substrate an einem LPXTG-Motiv zwischen Threonin und Glycin unter Ausbildung eines Threonylthioesters spaltet und auf ein Oligoglycin-Nucleophil überträgt.

Als Schwerpunkte dieser Arbeit wurden Sortase-katalysierte Transpeptidierungen an niedermolekularen Peptidmodellen untersucht sowie die Anwendung der Sortase bei der Konstruktion eines 23 kDa großen Rezeptormimetikums, der Fluoreszenzmarkierung von Proteinen sowie zur Synthese von peptidmodifizierten Peptidnucleinsäuren (PNAs) demonstriert. PNAs sind Oligonucleotid-Analoga bei denen das Ribosephosphatrückgrat durch ein ungeladenes Peptidrückgrat ersetzt ist. Obwohl sie spezifisch an komplementäre RNA oder DNA binden und stabil gegenüber Nucleasen und Proteasen sind, steht einem Einsatz als Therapeutika jedoch ihre geringe Membranpermeabilität im Weg. Eine mögliche Lösung dieses Problems ist die kovalente Anknüpfung von zellpenetrierenden Peptiden (CPPs) an PNAs. Die Synthese von PNAs erfolgt nach den gleichen Prinzipien wie die Festphasensynthese von Peptiden. Die kontinuierliche Synthese entsprechender PNA-CPP-Konjugate führt

jedoch häufig zu nicht trennbaren Mischungen, da die Konjugate oftmals zur Aggregation neigen, weshalb sich auch hier Ligationsmethoden anbieten.

Für die Experimente zu der vorliegenden Arbeit wurde das Enzym rekombinant in *E. coli* exprimiert und war nach Reinigung mittels IMAC aktiv. Zur Untersuchung der Enzymaktivität wurde ein einfacher HPLC-basierter Assay etabliert, bei dem die enzymkatalysierte Umsetzung von Dansyl-markierten Substraten mit Triglycyl-Nucleophilen bestimmt werden konnte. Dieser Assay wurde genutzt, um den Einfluss von Aminosäuresubstitutionen im Substrat und im Nucleophil auf die Reaktionsgeschwindigkeit sowie die Gleichgewichtslage der Transpeptidierung zu studieren. Es konnte gezeigt werden, dass nicht nur das aus der Literatur bekannte LPXTG-Motiv den Reaktionsverlauf bestimmt. Vielmehr besitzen die C-terminal auf dieses Motiv folgenden Reste einen großen Einfluss auf die Gleichgewichtslage und/oder Kinetik der Reaktion.

Sortase A ist ein recht robustes Enzym, das die Verwendung von Löslichkeitsfördernden Zusätzen wie Harnstoff ( $1 \text{ mol l}^{-1}$ ) bzw. 20% DMSO oder PEG ohne nennenswerten Aktivitätsverlust toleriert. Dies ist wichtig für die Ligation von in Wasser schwerlöslichen oder zur Aggregation neigenden Substraten und Nucleophilen. Hinsichtlich einer gezielten Inhibition von Sortase A durch Peptidylketoaldehyde wurde eine entsprechende Aktivität im mikromolaren Bereich beobachtet, wobei jedoch kein selektiver Effekt des Erkennungsmotivs gefunden wurde.

Die an den Peptidmodellen gewonnenen Resultate wurden schließlich für den Aufbau eines löslichen Rezeptors für das Neuropeptid Corticotropin-Releasing Factor (CRF) genutzt. Das Konstrukt – bestehend aus den vier extrazellulären Domänen des CRF<sub>1</sub>-Rezeptors – wurde durch Kombination von molekularbiologischen, enzymatischen und chemischen Synthesestrategien erhalten. Die drei extrazellulären Loops wurden mittels NCL cyclisiert und schrittweise über Thiol-Maleimidligationen regiospezifisch an ein Peptidtemplat geknüpft, das die drei intrazellulären Loops sowie die sieben Transmembranhelices ersetzt. Ein Schlüsselschritt war die Sortase-vermittelte Ligation des in *E. coli* exprimierten, drei Disulfidbrücken enthaltenden Rezeptor-N-Terminus an das 3-Loop-Konstrukt. Das erhaltene 23 kDa große Rezeptormimetikum war nach chromatographischer Reinigung homogen gemäß HPLC und MS. Es zeigte eine spezifische, hoch affine Bindung zu natürlichen Peptidliganden des CRF<sub>1</sub>-Rezeptors.

Weiterhin konnte demonstriert werden, dass sich Sortase für die selektive Markierung von Proteinen hervorragend eignet. So wurde ein Dansyl-Fluoreszenzlabel (Gly-Gly-Gly-Lys(Dns)-NH<sub>2</sub>) C-terminal an das 50 kDa Protein NEMO (exprimiert in *E. coli* als NEMO-LPKTGGRHHHHH) geknüpft.

Als weiteres Anwendungsbeispiel der Sortase-vermittelten Ligation diene die Darstellung von PNA–CPP-Konjugaten. Bei der Festphasensynthese von PNAs als Ausgangsstoffe für die Sortase-vermittelte Ligation unter Verwendung von PyBOP als Kupplungsreagenz wurde eine – in der PNA-Synthese bisher unbekannte – Nebenreaktion mit Guaninresten gefunden. Der Verlauf dieser Nebenreaktion konnte aufgeklärt werden, sie wurde durch die Verwendung von HATU vermieden. Die durch Synthese mit HATU erhaltenen PNAs wurden mittels Sortase-vermittelter Ligation mit verschiedenen CPPs verknüpft. Die Verwendung von Überschüssen des Peptides und die Entfernung der niedermolekularen Abgangsgruppe durch Dialyse erwies sich als sehr effektiv und gestattete gute bis hervorragende Kupplungsausbeuten von bis zu 94%. Die biologische Wirkung der erhaltenen CPP–PNA-Konjugate konnte in Aufnahmeuntersuchungen an Zellen gezeigt werden.

Durch die geringe Toleranz der Sortase gegenüber Änderungen am Erkennungsmotiv ist die Sortase-vermittelte Ligation hoch spezifisch. Insbesondere das geringe Vorkommen dieses Motivs in Säugerproteinen, macht die Reaktion interessant für die Modifizierung von Proteinen, obwohl – bedingt durch den Mechanismus – das Erkennungsmotiv im Produkt verbleibt. Bei keiner zu dieser Arbeit durchgeführten Sortase-vermittelten Ligation wurde – solange ein Nucleophil vorhanden war – Proteolyse des Substrates oder Produktes beobachtet. Dies ist ein entscheidender Vorteil des hier verwendeten Enzyms gegenüber anderen Proteasen, die für Ligationen eingesetzt werden. Durch die milden Reaktionsbedingungen – wässriger, neutraler Puffer, keine Notwendigkeit der Zugabe von Thiolen oder anderen Reduktionsmitteln – eignet sich Sortase A insbesondere auch für labile Substrate, wie z. B. über Disulfidbrücken gefaltete, sulfatierte oder glycosylierte Proteine. Zur Erweiterung des Substratspektrums könnte in weiterführenden Studien versucht werden durch Manipulation des Enzyms mit molekularbiologischen Techniken (z. B. ortsgerichtete Mutagenese) das Erkennungsmotiv gezielt zu verändern. Darüber hinaus sind mittels der kürzlich in unserem Labor exprimierten Sortase B sequentielle, enzymatische Ligationen an Substraten mit zwei orthogonalen Erkennungsmotiven – LPXTG für Sortase A und NPQTN für Sortase B – denkbar.

### **3. Experimenteller Teil**

#### **3.1. Allgemeines**

##### **3.1.1. Allgemeine Arbeitstechniken**

Gereinigte Produkte wurden in ACN/Wasser gelöst, im Ethanol-Trockeneis-Kältebad eingefroren und über Nacht gefriergetrocknet. Die erhaltenen Lyophilisate wurden bei -18°C gelagert.

##### **3.1.2. Lösungsmittel**

Die für manuelle Synthesen verwendeten organischen Lösungsmittel wurden über Molsieb 3 Å getrocknet. Alle anderen Reagenzien wurden ohne weitere Reinigung eingesetzt.

##### **3.1.3. UV-Spektrometer**

UV-Absorptionsmessungen wurden an einem Ultraspec II von LKB Biochrom durchgeführt.

##### **3.1.4. Chromatographische Methoden**

Für analytische HPLC wurde ein Shimadzu LC-2010C System mit einer ProntoSIL C18 Säule (250×4.6 mm, 5 µm, 300 Å, Fa. Bischoff) bzw. ein System von Jasco (Pumpen PU-980, Autosampler AS-950, UV-Detektor UV-975) mit einem Waters Fluoreszenzdetektor 474 unter Verwendung einer PolyEncap Säule (250×4.0 mm, 5 µm, 300 Å, Fa. Bischoff) verwendet. Soweit nicht anders erwähnt wurden in allen Fällen folgende Bedingungen verwendet: Laufmittel A: 0.1% TFA/Wasser (V/V); Laufmittel B: 80% ACN/0.1% TFA/Wasser (V/V/V); linearer Gradient von 5 bis 95% B in 40 min; Fluss 1 ml min<sup>-1</sup>; UV-Detektion für Peptide bei  $\lambda = 220$  nm, für PNAs bei  $\lambda = 260$  nm; Fluoreszenzdetektion von Dansyl  $\lambda_{\text{ex}} = 345$  nm,  $\lambda_{\text{em}} = 520$  nm. Die Analysen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Die präparative Reinigung und Isolierung der Peptide, PNAs, und Peptid-PNA-Konjugate erfolgte an einem LDC Analytical System (Controller constaMetric 3500, Pumpe constaMetric 3200, Detektor constaMetric 3200) bzw. an einem System von Shimadzu (Controller CBM-10A, Pumpen LC-8A, UV-Detektor SPD-6AV). Soweit nicht anders beschrieben wurden folgende Bedingungen verwendet: Säule: PolyEncap (250×20 mm, 10 µm, 300 Å, Fa. Bischoff); Laufmittel A: 0.1% TFA/Wasser (V/V);

Laufmittel B: 80% ACN/0.1% TFA/Wasser (V/V/V); linearer Gradient von 1 bis 50% B in 70 min; Fluss  $10 \text{ ml min}^{-1}$ ; UV-Detektion für Peptide bei  $\lambda = 220 \text{ nm}$ , für PNAs und Peptid-PNA-Konjugate bei  $\lambda = 260 \text{ nm}$ . Die Trennungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

### 3.1.5. Massenspektrometer

MS-Spektren wurden an einem MALDI-TOF-Instrument (Voyager-DE STR, Perseptive Biosystems), MS/MS-Spektren an einem MALDI-TOF/TOF Instrument (4700 Proteomics Analyzer, Applied Biosystems) ausgestattet mit einem Nd:YAG-Laser (355 nm) bei einer Frequenz von 200 Hz aufgenommen. Auf dem MALDI-Target wurden jeweils  $1 \mu\text{l}$  der Probenlösung (ca.  $0.1 \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$  Probe in ACN/Wasser 6/4 (V/V), 0.3% TFA) mit  $1 \mu\text{l}$  der Matrixlösung ( $5 \text{ mg ml}^{-1}$   $\alpha$ -Cyano-4-hydroxymethylsäure in ACN/Wasser 6/4 (V/V), 0.3% TFA) gemischt und an der Luft bei RT getrocknet. Die angegebenen Werte sind  $m/z$ -Daten.

### 3.1.6. LC-MS

HPLC gekoppelt mit ESI-MS erfolgte an einer Waters Acquity UPLC mit LCT Premier TOF Massenspektrometer. Soweit nicht anders erwähnt wurden folgende Bedingungen verwendet: Säule: Atlantis dC18 ( $30 \times 2.1 \text{ mm}$ ,  $3 \mu\text{m}$ ); Laufmittel A: 1% ACN/0.05% TFA/Wasser (V/V/V); Laufmittel B: 99% ACN/0.05% TFA/Wasser (V/V/V); linearer Gradient von 5 bis 95% B in 6 min; Fluss  $0.2 \text{ ml min}^{-1}$ ; UV-Detektion bei  $\lambda = 220 \text{ nm}$ . Die Trennungen wurden bei  $30^\circ\text{C}$  durchgeführt.



## 3.2. Experimente

### 3.2.1. Ausgangsstoffe

Folgende Edukte, Reagenzien und Lösungsmittel wurden bei nachstehenden Firmen erworben:

Acetanhydrid	Fluka	Hydroxybenzotriazol-monohydrat	Fluka
Acetonitril	Fisher Scientific	Imidazol	Merck
Aminosäure-Derivate	GLS China	IPTG	BTS Biotech
Ammoniumpersulfat	Sigma	m-Kresol	Fluka
Calciumchlorid-Hexahydrat	Baker	1-Methylpyrrolidin-2-on	Riedel-de Haën
2-Chlorotriethylchloridharz	NovaBiochem	NaHCO <sub>3</sub>	Merck
Chloroform	Roth	Natriumchlorid	Sigma
Chymotrysin	Roche	PEG	Aldrich
CTAB	Sigma	Phenol	Riedel-de Haën
Dansylchlorid	Fluka	Piperidin	Acros
demineralisiertes Wasser	Millipore 18 MΩ	PNA-Monomere	Applied Biosystems
Dialysemembranen	Spectrum Laboratories	PyBOP	NovaBiochem
Dichlormethan	Fisher Scientific	Salzsäure	J. T. Baker
Diethylether	J. T. Baker	SDS	Serva
Diisopropylcarbodiimid	Fluka	sym-Collidin	Fluka
Diisopropylethylamin	Acros	TCEP	Pierce
N,N-Dimethylformamid	Acros	TEMED	Roth
Dimethylsulfoxid	Fluka	TentaGel SRAM Harz	Rapp Polymere
Eisessig	J. T. Baker	Thioanisol	Fluka
Ethandithiol	Fluka	Trifluoressigsäure	Acros
Fmoc-Egl-OH	Fluka	Trifluorethanol	Roth
Glutathion	Calbiochem	TFMSA	Fluka
Guanidinhydrochlorid	Fluka	Triisopropylsilan	Fluka
HATU	GL Biochem	Tris	Merck
HBTU	IRIS Biotech	Trypsin	Promega

### 3.2.2. Allgemeine Vorschrift zur manuellen Synthese von Peptiden

Wenn nicht anders angegeben, wurden folgende Aminosäurederivate für die Synthese verwendet: Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH und Fmoc-Val-OH.

Für manuelle Peptidsynthesen wurden 250 mg TentaGel SRAM Harz ( $0.25 \text{ mmol g}^{-1}$  Beladung) in Plastikreaktoren mit Fritte vorgelegt. Die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe erfolgte mit 4 ml 20% Piperidin/DMF (5 min und 10 min). Zur Kupplung wurden nacheinander dazugegeben: 16 Äq. Aminosäurederivat als Feststoff, 16 Äq. HBTU als Feststoff, 1 ml DMF und 32 Äq. DIPEA. Es wurden Doppelkupplungen durchgeführt ( $2 \times 20 \text{ min}$ ). Zwischen den einzelnen Schritten wurde  $4 \times$  mit 4 ml DMF gewaschen.

Die Endabspaltung vom Harz und die Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen erfolgte mit Trifluoressigsäure, der die angegebenen Fänger zugesetzt waren. Es wurde filtriert und das Harz jeweils  $2 \times$  mit 2 ml TFA und DCM gewaschen. Das Lösungsmittel der vereinigten Filtrate wurde im Vakuum weitgehend entfernt und das zurückbleibende Peptid mit Diethylether gefällt. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert,  $2 \times$  mit Diethylether gewaschen und erneut zentrifugiert, an der Luft getrocknet und aus Acetonitril/Wasser/0.1% TFA lyophilisiert.

### 3.2.3. Automatisierte Peptidsynthese

Automatisierte Peptidsynthesen wurden mit Applied Biosystems 433A Peptidsynthesizern durchgeführt. Jeweils 1.0 g TentaGel SRAM Harz ( $0.25 \text{ mmol g}^{-1}$  Beladung) wurden vorgelegt. Die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe erfolgte mit 5 ml 20% Piperidin/DMF (mind.  $3 \times 2.5 \text{ min}$ ). Zur Kupplung wurden nacheinander dazugegeben: 2 ml Aminosäurederivat ( $1 \text{ mol l}^{-1}$  in DMF, 8 Äq.), 2 ml HBTU ( $0.5 \text{ mol l}^{-1}$ , 4 Äq.)/HOBt ( $0.5 \text{ mol l}^{-1}$ , 4 Äq.) in DMF und 1 ml DIPEA ( $2 \text{ mol l}^{-1}$  in NMP, 16 Äq.). Es wurden Doppelkupplungen durchgeführt ( $1 \times 10 \text{ min}$  und  $1 \times$  mind. 20 min). Zwischen den einzelnen Schritten wurde mind.  $5 \times$  mit 5 ml DMF gewaschen.

Gleichzeitige Synthese von maximal 24 Peptiden erfolgte an einem MultiSynTech Syro II. Jeweils 250 mg TentaGel SRAM Harz ( $0.25 \text{ mmol g}^{-1}$  Beladung) wurden vorgelegt.

Die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe erfolgte mit 2 ml 20% Piperidin/DMF (2× 5 min). Zur Kupplung wurden nacheinander dazugegeben: 500 µl Aminosäurederivat (0.5 mol l<sup>-1</sup> in DMF, 4 Äq.), 500 µl HBTU (0.5 mol l<sup>-1</sup>, 4 Äq.)/HOBt (0.5 mol l<sup>-1</sup>, 4 Äq.) in DMF und 250 µl DIPEA (2 mol l<sup>-1</sup> in NMP, 8 Äq.). Es wurden Doppelkupplungen durchgeführt (2× 20 min). Zwischen den einzelnen Schritten wurde 5× mit 2 ml DMF gewaschen.

Die Endabspaltung vom Harz erfolgte wie in Abschnitt 3.2.2 beschrieben.

#### 3.2.4. Isolierung der genomischen DNA aus *S. aureus*

1.5 ml einer Übernachtskultur von *S. aureus* in Blutkulturmedium wurden für 5 min bei maximaler Drehzahl abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 567 µl TE-Puffer (10 mmol l<sup>-1</sup> Tris-HCl, 1 mmol l<sup>-1</sup> EDTA, pH 8.0), 30 µl SDS (10% in Wasser) und 3 µl Proteinase K (20 mg ml<sup>-1</sup>) aufgenommen, vorsichtig gemischt und 1 h bei 37°C inkubiert. Es wurden 100 µl NaCl (5 mol l<sup>-1</sup> in Wasser) dazugegeben, gemischt, 80 µl erwärmte CTAB/NaCl-Lösung (2% CTAB, 1.4 mol l<sup>-1</sup> NaCl, 20 mmol l<sup>-1</sup> EDTA, 100 mmol l<sup>-1</sup> Tris-HCl, pH 8.0) dazugegeben, gemischt und für 10 min bei 65°C inkubiert. Es wurde mit dem gleichen Volumen Chloroform extrahiert, zentrifugiert (5 min, 4°C), die wässrige Phase mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform (1/1, V/V) extrahiert und erneut zentrifugiert (5 min, 4°C). Aus der wässrigen Phase wurde die genomische DNA mit dem 0.6 fachen Volumen Isopropanol gefällt und abzentrifugiert (15 min, 4°C). Das DNA-Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen, zentrifugiert, an der Luft getrocknet, in 100 µl TE-Puffer aufgenommen und 10 min bei 68°C inkubiert.<sup>[138]</sup>

#### 3.2.5. Expression und Reinigung von Sortase A

Die der Sortase A entsprechende Sequenz wurde ohne die N-terminale Signalsequenz (Aminosäuren 1-59) aus der genomischen DNA von *S. aureus* mittels PCR amplifiziert. Dafür wurden die Primer (5'-GATATACATATGCAAGCTAAACCTCAAATTCCG-3' und 5'-GTGGTGCTCGAGTTTGACTTCTGTAGCTACAAAGAT-3') verwendet. Das DNA-Fragment wurde mit den Restriktionsenzymen Nde I und Xho I verdaut und anschließend in einen pET-23b Vektor (Novagen) kloniert. Dieser ermöglicht die Expression von Sortase mit einem C-terminalen His<sub>6</sub>-Tag. Das Plasmid wurde in *E. coli* BL21(DE3) Zellen transformiert.<sup>[84]</sup> Für die Proteinexpression ließ man die Zellkultur in 2 l LB Medium, welches 100 mg l<sup>-1</sup> Ampicillin enthielt, bis zu einer Extinktion von 1.2 bis 1.4 (600 nm) wachsen. Die Zellsuspension wurde 20 min bei 5000 rpm zentrifugiert und das Zellpellet in 20 mmol l<sup>-1</sup> Tris-HCl, 0.1% Triton, pH 8.0 resuspendiert. Die Zellen

wurden mittels French Press aufgeschlossen und die Zelltrümmer abzentrifugiert (20 min, 22000 rpm, 4°C). 1 ml des Überstands wurde auf 1 ml Harz gegeben, an welchem  $\text{Co}^{2+}$ -Ionen gebunden waren (BD Talon Metal Affinity Resin, BD Biosciences). Die Säule wurde mit 10 ml Waschpuffer ( $10 \text{ mmol l}^{-1}$  Tris-HCl,  $500 \text{ mmol l}^{-1}$  NaCl,  $30 \text{ mmol l}^{-1}$  Imidazol, pH 7.5) gewaschen. Die Elution erfolgte mit 1 ml Elutionspuffer ( $10 \text{ mmol l}^{-1}$  Tris-HCl,  $50 \text{ mmol l}^{-1}$  NaCl,  $250 \text{ mM}$  Imidazol, pH 7.5). Das Eluat wurde unter Schütteln für 3 h bei RT mit  $10 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$  Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP) reduziert. TCEP und Imidazol wurden durch Dialyse gegen  $50 \text{ mmol l}^{-1}$  Tris-HCl,  $150 \text{ mmol l}^{-1}$  NaCl,  $5 \text{ mmol l}^{-1}$   $\text{CaCl}_2$ , pH 7.5 entfernt (MWCO 3500, Spectrum Laboratories). Die gereinigte Sortase A (SrtA(60-204) oder SrtA $_{\Delta\text{N}59}$ ) wurde mittels SDS-PAGE, HPLC und MALDI-MS charakterisiert. Bei der Gelelektrophorese war eine Bande bei ca. 25 kDa sichtbar, die HPLC zeigte einen Peak ohne Verunreinigungen, die MALDI-MS die korrekte Masse ( $m/z$ : ber. 17794, gef.  $17798 \pm 10$ ). Die Konzentration der Sortase wurde nach der Methode von Bradford mit BSA als Standard bestimmt.<sup>[139]</sup> Dazu wurde ein Safire Plattenlesegerät (Tecan) bei der Wellenlänge 595 nm verwendet. Insgesamt wurden 17 mg Sortase in einer Konzentration von  $13 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$  erhalten. Die Lösung wurde aliquotiert und bei -18°C aufbewahrt.

### 3.2.6. SDS-PAGE

Für die SDS-PAGE wurden folgende Puffer verwendet:

#### SDS-Laufpuffer

Stammlösung (10×): 144 g Glycin, 30 g Tris, 10 g SDS, pH 8.4 auf 1 l mit Wasser aufgefüllt. Die Stammlösung wurde vor Gebrauch mit Wasser auf 1/10 verdünnt.

#### Trenngel (15%)

2.5 ml Trenngelpuffer ( $1.5 \text{ mol l}^{-1}$  Tris-HCl, pH 8.8 in Wasser), 2.5 ml  $\text{H}_2\text{O}$ , 5.0 ml Acrylamidstammlösung (30%ig mit 0.8% Bisacrylamid in Wasser), 100  $\mu\text{l}$  SDS (10%), 40  $\mu\text{l}$  APS ( $100 \text{ g l}^{-1}$  in Wasser), 10  $\mu\text{l}$  TEMED.

#### Sammelgel

2.5 ml Sammelgelpuffer ( $0.5 \text{ mol l}^{-1}$  Tris-HCl, pH 6.8 in Wasser), 6.25 ml  $\text{H}_2\text{O}$ , 1.25 ml Acrylamidstammlösung, 100  $\mu\text{l}$  SDS (10%), 40  $\mu\text{l}$  APS ( $100 \text{ g l}^{-1}$  in Wasser), 10  $\mu\text{l}$  TEMED.

**SDS-Probenpuffer (3×)**

0.5 mol l<sup>-1</sup> Tris, 10% Glycerol (V/V), 10% SDS (V/V), 0.1% Bromphenolblau, pH 6.8

Der SDS-Probenpuffer wurde vor Gebrauch mit Wasser auf 1/3 verdünnt.

**Coomassie-Färbelösung**

0.1% Coomassie Brilliant Blue R-250, 50% Ethanol (V/V), 10% Eisessig (V/V), Wasser.

**Coomassie-Entfärbelösung**

30% Ethanol (V/V), 7% Eisessig (V/V), Wasser.

**Molmassenmarker**

SeeBlue<sup>®</sup> Plus2 Pre-Stained Proteinstandard (Invitrogen).

### **3.2.7. Synthese und Analytik der Peptidbibliotheken für die Optimierung der Sortase-Erkennungssequenz**

Die Peptide wurden gemäß der in Abschnitt 3.2.3 beschriebenen Methode parallel synthetisiert. Die Anknüpfung des Dansyl-Fluorophors erfolgte manuell nach der letzten Fmoc-Abspaltung durch Zugabe von 94 µl DIPEA (2 mol l<sup>-1</sup> in NMP, 3 Äq.) und 625 µl Dansylchlorid in DMF (0.2 mol l<sup>-1</sup>, 2 Äq.) für 2× 20 min. Abspaltung vom Harz und Entschützen der Seitenketten erfolgte durch Zugabe von 2 ml einer Mischung von 5% Phenol, 2% Triisopropylsilan und 5% Wasser in TFA für 2 h. Soweit notwendig, wurden die Peptide chromatographisch gereinigt (gemäß Abschnitt 3.1.4, linearer Gradient von 1 bis 40% B in 70 min). Alle Peptide wurden mittels HPLC und MS charakterisiert und zeigten Reinheiten >90% und die berechneten Massen (Tabelle 11).

**Tabelle 11.** Analysendaten der Peptidbibliotheken **5**, **9** und dem Nucleophil **6**.

Nr.	Formel	Sequenz	M in g mol <sup>-1</sup>	[M] <sup>+</sup> ber.	[M+H] <sup>+</sup> gef.	Reinheit (%)
1	<b>5a</b>	Dns-LPKTGARR-NH <sub>2</sub>	1130.36	1129.62	1130.44	92
2	<b>5d</b>	Dns-LPKTGDRR-NH <sub>2</sub>	1174.37	1173.61	1174.60	97
3	<b>5e</b>	Dns-LPKTGERR-NH <sub>2</sub>	1188.40	1187.62	1188.62	94
4	<b>5f</b>	Dns-LPKTGFRR-NH <sub>2</sub>	1206.46	1205.65	1206.61	95
5	<b>5g</b>	Dns-LPKTGGRR-NH <sub>2</sub>	1116.33	1115.60	1116.51	95
6	<b>5h</b>	Dns-LPKTGHRR-NH <sub>2</sub>	1196.42	1195.64	1196.39	94
7	<b>5i</b>	Dns-LPKTGIRR-NH <sub>2</sub>	1172.44	1171.66	1172.42	91
8	<b>5k</b>	Dns-LPKTGKRR-NH <sub>2</sub>	1187.46	1186.68	1187.45	96
9	<b>5l</b>	Dns-LPKTGLRR-NH <sub>2</sub>	1172.44	1171.66	1172.38	97 <sup>a</sup>
10	<b>5m</b>	Dns-LPKTGMRR-NH <sub>2</sub>	1190.48	1189.62	1190.55	95 <sup>a</sup>
11	<b>5n</b>	Dns-LPKTGNRR-NH <sub>2</sub>	1173.39	1172.62	1173.57	97
12	<b>5p</b>	Dns-LPKTGPRR-NH <sub>2</sub>	1156.40	1155.63	1156.58	94
13	<b>5q</b>	Dns-LPKTGQRR-NH <sub>2</sub>	1187.41	1186.64	1187.58	92
14	<b>5r</b>	Dns-LPKTGRRR-NH <sub>2</sub>	1215.47	1214.68	1215.48	94
15	<b>5s</b>	Dns-LPKTGSRR-NH <sub>2</sub>	1146.36	1145.61	1146.55	91
16	<b>5t</b>	Dns-LPKTGTRR-NH <sub>2</sub>	1160.39	1159.63	1160.53	93
17	<b>5v</b>	Dns-LPKTGVRN-NH <sub>2</sub>	1158.41	1157.69	1158.48	92
18	<b>5w</b>	Dns-LPKTGWRR-NH <sub>2</sub>	1245.49	1244.66	1245.53	>99 <sup>a</sup>
19	<b>5y</b>	Dns-LPKTGYRR-NH <sub>2</sub>	1222.46	1221.64	1222.53	93
20	<b>9a</b>	Dns-LPKTGGARR-NH <sub>2</sub>	1187.41	1186.64	1187.50	99
21	<b>9d</b>	Dns-LPKTGGDRR-NH <sub>2</sub>	1231.42	1230.63	1231.61	99
22	<b>9e</b>	Dns-LPKTGGERR-NH <sub>2</sub>	1245.45	1244.64	1245.61	99
23	<b>9f</b>	Dns-LPKTGGFRR-NH <sub>2</sub>	1263.51	1262.67	1263.67	97
24	<b>9g</b>	Dns-LPKTGGGRR-NH <sub>2</sub>	1173.39	1172.62	1173.53	99
25	<b>9h</b>	Dns-LPKTGGHRR-NH <sub>2</sub>	1253.47	1252.66	1253.69	99
26	<b>9i</b>	Dns-LPKTGGIRR-NH <sub>2</sub>	1229.49	1228.69	1228.60	97
27	<b>9k</b>	Dns-LPKTGGKRR-NH <sub>2</sub>	1244.51	1243.70	1244.27	99
28	<b>9l</b>	Dns-LPKTGGGLRR-NH <sub>2</sub>	1229.49	1228.69	1229.42	97
29	<b>9m</b>	Dns-LPKTGGMRR-NH <sub>2</sub>	1247.53	1246.64	1247.09	91
30	<b>9n</b>	Dns-LPKTGGNRR-NH <sub>2</sub>	1230.44	1229.64	1230.49	99
31	<b>9p</b>	Dns-LPKTGGPRR-NH <sub>2</sub>	1213.45	1212.65	1213.50	98

Nr.	Formel	Sequenz	M in g mol <sup>-1</sup>	[M] <sup>+</sup> ber.	[M+H] <sup>+</sup> gef.	Reinheit (%)
32	<b>9q</b>	Dns-LPKTGGQRR-NH <sub>2</sub>	1244.46	1243.66	1244.52	99
33	<b>9r</b>	Dns-LPKTGGRRR-NH <sub>2</sub>	1272.52	1271.70	1272.22	97
34	<b>9s</b>	Dns-LPKTGGSRR-NH <sub>2</sub>	1203.41	1202.63	1204.11	99
35	<b>9t</b>	Dns-LPKTGGTRR-NH <sub>2</sub>	1217.44	1216.65	1217.34	97
36	<b>9v</b>	Dns-LPKTGGVRR-NH <sub>2</sub>	1215.47	1214.67	1215.42	99
37	<b>9w</b>	Dns-LPKTGGWRR-NH <sub>2</sub>	1302.54	1301.68	1302.50	>99 <sup>a</sup>
38	<b>9y</b>	Dns-LPKTGGYRR-NH <sub>2</sub>	1279.51	1278.67	1279.57	94
39	<b>6</b>	H-GGGWW-NH <sub>2</sub>	560.60	560.25	561.25	99 <sup>a</sup>
40	<b>7</b>	Dns-LPKTGGGWW-NH <sub>2</sub>	1233.44	1232.58	1233.57	97 <sup>a</sup>
41	<b>8g</b>	H-GGRR-NH <sub>2</sub>	443.50	443.27	443.25	92
42		H-GGGRR-NH <sub>2</sub>	500.56	500.29	501.30	>99
43		H-GGGGG-NH <sub>2</sub>	302.29	302.13	303.13	>95

<sup>a</sup> Gereinigtes Produkt.

### 3.2.8. Allgemeine Vorschrift für die Sortase-vermittelte Ligation der beiden Bibliotheken

Lösungen der Peptide **5** oder **9** (0.33 mmol l<sup>-1</sup>), **6** (0.33 mmol l<sup>-1</sup>) und 4.4 μmol l<sup>-1</sup> oder 6.6 μmol l<sup>-1</sup> Sortase A in Tris-HCl (50 mmol l<sup>-1</sup>), NaCl (150 mmol l<sup>-1</sup>), CaCl<sub>2</sub> (5 mmol l<sup>-1</sup>) eingestellt auf pH 7.5 (Puffer A) wurden bei 23°C geschüttelt. Jeweils 60 μl der Reaktionsmischung wurden nach 7 und 24 h mit 20 μl Salzsäure (1 mol l<sup>-1</sup>) angesäuert und mittels HPLC mit Fluoreszenzdetektion analysiert (gemäß Abschnitt 3.1.4, linearer Gradient von 5 bis 55% B in 22 min).

### 3.2.9. Bestimmung des Umsatzes für die Sortase-vermittelte Ligation mittels HPLC in Abhängigkeit von der Zeit

Lösungen der Peptide **5** (X<sup>1</sup> = Gly, Asp, Leu, Ser; 0.33 mmol l<sup>-1</sup>), **6** (0.33 mmol l<sup>-1</sup>) und 6.4 μmol l<sup>-1</sup> Sortase A in Puffer A wurden bei 23°C geschüttelt. Aliquote der Reaktionsmischung wurden nach 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6.5, 7, 8, 24, 48 und 72 h wie oben beschrieben analysiert. Eine Lösung der Peptide **7** (0.33 mmol l<sup>-1</sup>), **8** (X<sup>1</sup> = Gly; 0.33 mmol l<sup>-1</sup>) und 6.4 μmol l<sup>-1</sup> Sortase A in Puffer A/5% DMSO (V/V) wurde ebenso analysiert (DMSO wurde wegen der Schwerlöslichkeit von **7** in Puffer A zugesetzt).

### 3.2.10. Bestimmung des Umsatzes der Sortase-vermittelten Ligation von Dns-LPKTGGGX<sup>3</sup>X<sup>3</sup>-NH<sub>2</sub> mit H-GGGX<sup>4</sup>X<sup>4</sup>-NH<sub>2</sub>

Eine Lösung des Substrates Dns-LPKTGGGX<sup>3</sup>X<sup>3</sup>-NH<sub>2</sub> (X<sup>3</sup> = Arg oder Trp; 0.33 mmol l<sup>-1</sup>), des Nucleophils H-GGGX<sup>4</sup>X<sup>4</sup>-NH<sub>2</sub> (X<sup>4</sup> = Arg, Trp oder Gly; 0.33 mmol l<sup>-1</sup>) und Sortase A (4.0 µmol l<sup>-1</sup>) in Puffer A wurde bei 23°C geschüttelt. Analyse der Mischung wie oben nach 24 und 48 h ergab gleiche Werte, was zeigte, dass sich die Reaktion im Gleichgewicht befand.

### 3.2.11. Datenbanksuche nach potentiellen, proteinogenen Substraten für Sortase A

Auf der Internetseite „<http://www.doe-mbi.ucla.edu/Services/Sortase>“ wurde nach folgenden Vorgaben gesucht: Query: All Species, Sortase Subfamily: All Subfamilies, Sortases/Substrates?: Substrates. Die erhaltenen Ergebnisse wurden sortiert, die zur Family Sortase B gehörigen Treffer manuell entfernt. Die relative Häufigkeit der Aminosäuren in den einzelnen Positionen des Erkennungsmotivs wurde mit MS Excel bestimmt.

### 3.2.12. Synthese und Analytik der unnatürlichen Substrate und Nucleophile

Die C-terminale Aminosäure von Dns-Leu-Pro-Lys-Thr-Gly-OH (Tabelle 12, Nr. 1) wurde manuell an 2-Chlortritylchlorid-Harz geknüpft. Dafür wurden 248 mg Harz (Beladung 1.3 mmol g<sup>-1</sup>) mit 46 mg Fmoc-Gly-OH (155 µmol, 0.48 Äq), 3 ml DCM und 42.8 µl DIPEA (250 µmol, 0.78 Äq) 1 h gerührt. Bei Dns-Leu-Pro-Lys-Thr-Egl-NH<sub>2</sub> (Nr. 3) und Dns-Leu-Pro-Lys-Thr-Ahx-NH<sub>2</sub> (Nr. 5) wurde der C-terminale Rest manuell an Tentagel SRAM-Harz geknüpft, die weitere Synthese erfolgte am multiplen Syntheseautomaten. Die Anknüpfung von Dansyl erfolgte manuell wie oben beschrieben (Abschnitt 3.2.7). Die Abspaltung vom Harz erfolgte durch Behandlung mit 6 ml DCM, 2 ml TFE und 2 ml Eisessig für 1 h, Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum und saurer Abspaltung mit 5 ml 5% Wasser/TFA für 1.5 h (Nr. 1) oder mit 2% TIPS/5% Wasser/TFA (Nr. 3 und 5).

H-Egl-Trp-Trp-NH<sub>2</sub> und H-Ahx-Trp-Trp-NH<sub>2</sub> (Nr. 4 und 6) wurden manuell synthetisiert, H-Gly-Pro-Gly-Trp-Trp-NH<sub>2</sub> (Nr. 2) am Syntheseautomaten. Die Abspaltung vom Harz erfolgte mit 5% Wasser in TFA. Alle Peptide wurden mittels HPLC und MS charakterisiert und zeigten die angegebenen Reinheiten sowie die berechneten Massen (Tabelle 12).



**Tabelle 12.** Analysendaten der synthetisierten unnatürlichen Substrate und Nucleophile.

Nr.	Sequenz	M in g mol <sup>-1</sup>	[M] <sup>+</sup> ber.	[M+H] <sup>+</sup> gef.	Reinheit (%)
1	Dns-Leu-Pro-Lys-Thr-Gly-OH	747.91	747.36	748.37	99
2	H-Gly-Pro-Gly-Trp-Trp-NH <sub>2</sub>	600.68	600.28	601.28	88
3	Dns-Leu-Pro-Lys-Thr-Egl-NH <sub>2</sub>	835.02	834.43	835.37	98
4	H-Egl-Trp-Trp-NH <sub>2</sub>	534.61	534.26	535.25	99
5	Dns-Leu-Pro-Lys-Thr-Ahx-NH <sub>2</sub>	803.02	802.44	803.40	81
6	H-Ahx-Trp-Trp-NH <sub>2</sub>	502.61	502.27	502.30	95

### 3.2.13. Bestimmung des Umsatzes der Sortase-vermittelten Ligation mit anderen Nucleophilen und Abgangsgruppen

Die Ligation wurde unter den gleichen Bedingungen wie bei den beiden Peptidbibliotheken durchgeführt (siehe Abschnitt 3.2.8).

### 3.2.14. Bestimmung der enzymatischen Aktivität in verschiedenen Lösungsmitteln

Eine Lösung, die 0.20 mmol l<sup>-1</sup> **5g**, 0.20 mmol l<sup>-1</sup> **6** und 3.8 µmol l<sup>-1</sup> Sortase A in Puffer A mit 1 oder 2 mol l<sup>-1</sup> Harnstoff oder 0, 20, 40 oder 60% (V/V) DMSO oder PEG enthielt, wurde bei 23°C geschüttelt. Nach 4 und 24 h wurden jeweils 20 µl der Mischung mit 50 µl Salzsäure (1 mol l<sup>-1</sup>) angesäuert und, wie in Abschnitt 3.2.8 beschrieben, mittels HPLC analysiert.

### 3.2.15. Manuelle Synthese von PNAs mit HATU oder PyBOP

Als Monomerbausteine wurden N-terminal Fmoc-geschützte Derivate verwendet. Exocyclische Aminofunktionen bei Guanin, Adenin und Cytosin waren mit Bhoc geschützt. PNA-Oligomere wurden manuell in Plastikreaktoren mit Fritte synthetisiert. Dazu wurden 40 mg TentaGel SRAM Harz (0.25 mmol g<sup>-1</sup> Beladung) vorgelegt. Die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe erfolgte mit 1 ml 20% Piperidin/DMF (30 s und 6 min). Zur Kupplung wurden nacheinander 5 Äq. Monomer in NMP (0.25 mol l<sup>-1</sup>), 4.5 Äq. HATU in DMF (0.23 mol l<sup>-1</sup>), 5 Äq. DIPEA und 5 Äq. Collidin zusammengegeben, 1 min voraktiviert und dann zum Harz gegeben. Es wurden Doppelkupplungen durchgeführt (2× 20 min). Nachfolgend wurden noch freie Aminogruppen durch Acetylierung (4% Acetanhydrid und 4% DIPEA in DMF, 1 min) blockiert. Zwischen den einzelnen Schritten wurde 4× mit 4 ml DMF gewaschen. Die

Endabspaltung vom Harz erfolgte mit 5% m-Kresol in TFA für 1 h. Die weitere Aufarbeitung geschah analog zur Peptidsynthese (siehe Abschnitt 3.2.2).

Sollte die Aktivierung mit PyBOP erfolgen, wurde folgendes Protokoll für die Kupplung verwendet: Doppelkupplung, 20 min, 5 Äq. Monomer in NMP ( $0.25 \text{ mol l}^{-1}$ ), 5 Äq. PyBOP in DMF ( $0.25 \text{ mol l}^{-1}$ ), 5 Äq. DIPEA, 5 Äq. Collidin.

### 3.2.16. Synthese der PNA-Modellfragmente 14 und 15

Das Peptid Leu-Pro-Lys-Thr-Gly-Gly-Arg wurde gemäß der Standardvorschrift an TentaGel SRAM Harz ( $0.22 \text{ mmol g}^{-1}$ ) synthetisiert. Die PNA-Monomere wurden danach entweder mit HATU oder PyBOP gekuppelt.

Aktivierung mit HATU: Einzelkupplung, 1 min Voraktivierung, 20 min, 5 Äq. Monomer in NMP ( $0.25 \text{ mol l}^{-1}$ ), 4.5 Äq. HATU in DMF ( $0.23 \text{ mol l}^{-1}$ ), 5 Äq. DIPEA, 5 Äq. Collidin.

Aktivierung mit PyBOP: Einzelkupplung, 20 min, 5 Äq. Monomer in NMP ( $0.25 \text{ mol l}^{-1}$ ), 5 Äq. PyBOP in DMF ( $0.25 \text{ mol l}^{-1}$ ), 5 Äq. DIPEA, 5 Äq. Collidin.

Acetylierung: 4%  $\text{Ac}_2\text{O}$ , 4% DIPEA in DMF, 1 min.

Fmoc-Abspaltung:  $2 \times 20\%$  Piperidin in DMF, 30 s/6 min.

Endabspaltung vom Harz: 5% m-Kresol in TFA, 1 h.

Die Endabspaltung vom Harz erfolgte für beide Ansätze je zur Hälfte mit bzw. ohne Abspaltung der N-terminalen Fmoc-Gruppe mit Piperidin.

### 3.2.17. Synthese der zellpenetrierenden Peptide 18-26

Die Peptide wurden gemäß dem Standardprotokoll am multiplen Syntheseautomaten synthetisiert, mit 2 ml einer Mischung von 5% Phenol, 2% Triisopropylsilan und 5% Wasser in TFA vom Harz abgespalten, aus Wasser/ACN lyophilisiert und falls notwendig chromatographisch gereinigt. Alle Peptide wurden mittels HPLC und MALDI-MS charakterisiert und zeigten Reinheiten  $>90\%$  und die berechneten Massen (Tabelle 13).

**Tabelle 13.** Analysendaten der CPPs **18-26**.

Name	Formel	M in g mol <sup>-1</sup>	[M] <sup>+</sup> ber.	[M+H] <sup>+</sup> gef.	Reinheit (%)
KLA	<b>18</b>	2586.34	2584.74	2585.92	95
	<b>19</b>	2047.65	2046.38	2047.49	99 <sup>a</sup>
ELA	<b>20</b>	2591.04	2589.47	2590.58	97 <sup>a</sup>
	<b>21</b>	2052.35	2051.11	2074.23 [M+Na] <sup>+</sup>	>99 <sup>a</sup>
KAL	<b>22</b>	2586.34	2584.74	2585.10	95 <sup>a</sup>
KGL	<b>23</b>	2502.18	2500.64	2501.29	91 <sup>a</sup>
RLA	<b>24</b>	2726.40	2724.77	2725.47	99 <sup>a</sup>
Pen	<b>25</b>	2955.62	2953.73	2654.86	96 <sup>a</sup>
	<b>26</b>	2416.93	2415.37	2416.53	96 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Bedingungen bei der chromatographischen Reinigung: **19**: 20 bis 70% B in 70 min; **20**, **21**: 30 bis 80% B in 70 min; **22**, **23**, **24**: 20 bis 80% B in 70 min; **25**, **26**: 10 bis 70% B in 70 min.

### 3.2.18. Synthese der PNAs 27-31

Die Peptidnucleinsäure-Oligomere wurden gemäß dem Standardprotokoll manuell mit HATU synthetisiert und chromatographisch (RP-HPLC) gereinigt (1 bis 50% B in 70 min). Alle PNAs wurden mittels HPLC und MS charakterisiert und zeigten Reinheiten >90% und die berechneten Massen (Tabelle 14).

**Tabelle 14.** Analysendaten der PNAs **27-31**.

Name	Formel	M in g mol <sup>-1</sup>	[M] <sup>+</sup> ber.	[M+H] <sup>+</sup> gef.	Reinheit (%)
PNA	<b>27</b>	6388.39	6384.79	6387.81	>99
	<b>28</b>	5807.67	5804.42	5809.26	97
PNA scr	<b>29</b>	6388.39	6384.79	6386.26	91
	<b>30</b>	5807.67	5804.42	5805.40	98
FAM-PNA	<b>31</b>	6704.67	6700.82	6707.49	>99

### 3.2.19. Synthese der CPP–PNA-Konjugate mittels Sortase-vermittelter Ligation

600 µl einer Lösung bestehend aus CPP (1.67 mmol l<sup>-1</sup>), PNA (0.33 mmol l<sup>-1</sup>) und Sortase A (5.6 µmol l<sup>-1</sup>) in Puffer A wurde bei RT gegen 1 l desselben Puffers für 24 h dialysiert (MWCO 2000, Spectrum Labs). Die Konjugate wurden chromatographisch gereinigt (PolyEncap, 250×8.0 mm, 10 µm, 300 Å, 50°C, 4 ml min<sup>-1</sup>, 1 bis 80% B in 70 min), mittels HPLC und MALDI-MS charakterisiert und zeigten die angegebenen Reinheiten und die berechneten Massen (Tabelle 15).

**Tabelle 15.** Analysendaten der CPP–PNA-Konjugate **33–46**.

Formel	Name	M in g mol <sup>-1</sup>	[M+H] <sup>+</sup> gef. <sup>a</sup>	Reinheit (%)
<b>33</b>	KLA-PNA	8106.65	8107	>99
<b>34</b>	ELA-PNA	8111.36	8113	>99
<b>35</b>	KAL-PNA	8475.93	8472	>99
<b>36</b>	KGL-PNA	8106.65	8107	83
<b>37</b>	RLA-PNA	8022.49	8026	86
<b>38</b>	Pen-PNA	8246.72	8253	>99
<b>39</b>	KLA-PNA scr	8106.65	8104	>99
<b>40</b>	PNA-KLA	8148.69	8151	>99
<b>41</b>	PNA-ELA	8153.40	8155	>99
<b>42</b>	PNA-Pen	8517.97	8516	>99
<b>43</b>	PNA scr-KLA	8148.69	8150	>99
<b>44</b>	FAM-PNA-KLA	8464.95	8473	>99
<b>45</b>	FAM-PNA-ELA	8469.66	8475	>99
<b>46</b>	FAM-PNA-Pen	8834.23	8836	>99

<sup>a</sup> Gemessen mit MALDI-MS im linearen Modus (Messgenauigkeit  $\pm 10$ ).

### 3.2.20. Synthese des Peptidtemplats **47**

Das Peptidtemplat **47** (Biotin-K[Z-GGGQK{Mhx-Ahx-GEGK(Dde)GEGKGEG}GEG]-NH<sub>2</sub>) wurde gemäß dem Standardprotokoll am Automaten synthetisiert. Für die Lysinreste, die Verzweigungspunkte darstellen, wurde Fmoc-Lys(Dde)-OH verwendet. Die Dde-Gruppen wurden manuell durch Behandlung mit 2% Hydrazin in DMF für 10 min abgespalten. Der dritte Glycinrest wurde als Z-Gly-OH eingeführt. Das Produkt wurde mit 2% Triisopropylsilan/5% Wasser in TFA vom Harz abgespalten und mittels RP-HPLC gereinigt (PolyEncap 250×20 mm, 300 Å, 10 µm, linearer Gradient 20-70% B in 70 min).

HPLC: 97%, ESI-MS *m/z*: ber. 2631.23, gef. 2630.8  $\pm$  0.4.

### 3.2.21. Synthese des 1-Loop-Konstrukts **48**

Zu 33 mg (13 µmol) des Templats **47** und 37 mg (15 µmol) ECD4-SH gelöst in 0.4 ml DMSO wurden 1.6 ml Wasser und 0.25 ml NaHCO<sub>3</sub>-Lösung (1 mol l<sup>-1</sup>, pH 8.5) gegeben. Nach 1 h rühren bei RT hatte sich das Produkt quantitativ gebildet und wurde chromatographisch gereinigt (ProntoSIL C-18 250×20 mm, 300 Å, 10 µm, linearer Gradient 30-70% B in 70 min).

Ausbeute: 31 mg (49%), HPLC: >99%, ESI-MS  $m/z$ : ber. 5047.34, gef.  $5047.2 \pm 0.3$ .

### 3.2.22. Kupplung von Maleimidohexansäure an 48

Zu 61 mg (12  $\mu\text{mol}$ ) des 1-Loop-Konstrukts **48** und 32 mg (0.1 mmol) Mhx-OSu gelöst in 3 ml DMSO wurden 0.5 ml Wasser und 0.1 ml  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung (1  $\text{mol l}^{-1}$ , pH 8.5) gegeben. Nach 1 h rühren bei RT hatte sich das Produkt quantitativ gebildet und wurde mittels RP-HPLC gereinigt (ProntoSIL C-18 250×20 mm, 300 Å, 10  $\mu\text{m}$ , linearer Gradient 30-70% B in 70 min).

Ausbeute: 40.6 mg (64%), HPLC: >99%, ESI-MS  $m/z$ : ber. 5240.42, gef.  $5240.3 \pm 0.3$ .

### 3.2.23. Synthese des 2-Loop-Konstrukts 49

Zu 40.4 mg (7.7  $\mu\text{mol}$ ) des Maleimido-modifizierten 1-Loop-Konstrukts und 28.2 mg (12  $\mu\text{mol}$ ) ECD2-SH gelöst in 2 ml DMSO wurden 0.25 ml Wasser und 50  $\mu\text{l}$   $\text{NaHCO}_3$ -Lösung (1  $\text{mol l}^{-1}$ , pH 8.5) gegeben. Nach 1 h rühren bei RT hatte sich das Produkt quantitativ gebildet und wurde chromatographisch gereinigt (ProntoSIL C-18 250×20 mm, 300 Å, 10  $\mu\text{m}$ , linearer Gradient 30-70% B in 70 min).

Ausbeute: 33.8 mg (58%), HPLC: >99%, ESI-MS  $m/z$ : ber. 7588.59, gef.  $7589.0 \pm 0.5$ .

### 3.2.24. Hydrazinabspaltung vom 2-Loop-Konstrukt 49

Zu 63.5 mg (8.37  $\mu\text{mol}$ ) des 2-Loop-Konstrukts **49** gelöst in 50 ml ACN/Wasser (1/1) wurde solange wässrige Ammoniaklösung (0.25%) gegeben bis pH 6.3 eingestellt war und die Lösung lyophilisiert. Das Produkt wurde in 3.92 ml DMF gelöst und 80  $\mu\text{l}$  Hydrazin dazugegeben. Nach 10 min rühren bei RT war die Abspaltung quantitativ. Es wurde mit 200  $\mu\text{l}$  TFA angesäuert und mittels RP-HPLC gereinigt (ProntoSIL C-18 250×20 mm, 300 Å, 10  $\mu\text{m}$ , linearer Gradient 30-80% B in 70 min).

Ausbeute: 51 mg (82%), HPLC: >99%, ESI-MS  $m/z$ : ber. 7424.50, gef.  $7424.3 \pm 0.4$ .

### 3.2.25. Kupplung von Maleimidohexansäure an das 2-Loop-Konstrukt

Zu 51 mg (6.9  $\mu\text{mol}$ ) des Dde-entschützten 2-Loop-Konstrukts und 3.32 mg (0.01 mmol) Mhx-OSu gelöst in 3 ml DMSO wurden 0.5 ml Wasser und 0.1 ml  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung (1  $\text{mol l}^{-1}$ , pH 8.5) gegeben. Nach 90 min rühren bei RT hatte sich das Produkt quantitativ gebildet und wurde mittels RP-HPLC gereinigt (ProntoSIL C-18, 250×20 mm, 300 Å, 10  $\mu\text{m}$ , linearer Gradient 30-80% B in 70 min).

Ausbeute: 41 mg (78%), HPLC: 99%, ESI-MS  $m/z$ : ber. 7617.58, gef.  $7617.6 \pm 0.5$ .

### 3.2.26. Synthese des 3-Loop-Konstrukts 50

Zu 41 mg (5.4  $\mu\text{mol}$ ) des Maleimido-modifizierten 2-Loop-Konstrukts und 26 mg (8.7  $\mu\text{mol}$ ) ECD3-SH gelöst in 3 ml DMSO wurden 0.5 ml Wasser und 100  $\mu\text{l}$   $\text{NaHCO}_3$ -Lösung (1  $\text{mol l}^{-1}$ , pH 8.5) gegeben. Nach 1 h rühren bei RT hatte sich das Produkt quantitativ gebildet und wurde mittels RP-HPLC gereinigt (ProntoSIL C-18 250 $\times$ 20 mm, 300 Å, 10  $\mu\text{m}$ , linearer Gradient 30-80% B in 70 min).

Ausbeute: 42.1 mg (74%), HPLC: >99%, ESI-MS  $m/z$ : ber. 10589.0, gef. 10590.4  $\pm$  1.0.

### 3.2.27. Synthese des 3-Loop-Konstrukts 51 (Abspaltung der Z-Schutzgruppe)

42.1 mg (3.98  $\mu\text{mol}$ ) des 3-Loop-Konstrukts **50** wurden im Eisbad in einer Mischung aus 1.8 ml Thioanisol, 0.9 ml Ethandithiol, 18 ml TFA und 1.8 ml TFMSA gelöst. Es wurde 10 min bei 0°C gerührt. Die TFA wurde im Vakuum weitgehend entfernt, das Produkt aus Diethylether gefällt und mittels RP-HPLC gereinigt (ProntoSIL C-18 250 $\times$ 20 mm, 300 Å, 10  $\mu\text{m}$ , linearer Gradient 30-80% B in 70 min).

Ausbeute: 16.1 mg (39%), HPLC: >99%, ESI-MS  $m/z$ : ber. 10461.47, gef. 10461.2  $\pm$  0.6.

### 3.2.28. Expression und *in vitro* Rückfaltung des CRF<sub>1</sub>-Rezeptor-N-Terminus

Für eine Übernachtskultur von mit dem Plasmid pET-CRF<sub>1</sub>R-NT-LPKTGRR transformierten *E. coli* BL21(DE3) wurden 20 ml LB-Medium mit 20  $\mu\text{l}$  Ampicillin (100  $\text{mg ml}^{-1}$ ) und 200  $\mu\text{l}$  Bakterien-Glycerol-Stammkultur (Kryokultur) versetzt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am Folgetag wurde die Bakteriensuspension in 2 l LB-Medium mit 2 ml Ampicillin (100  $\text{mg ml}^{-1}$ ) gegeben und bei 37°C inkubiert bis eine Extinktion von 0.5 bis 0.7 erreicht (600 nm) war. Die Expression wurde durch Zugabe von 1 ml IPTG (1  $\text{mol l}^{-1}$ ) gestartet. Nach 3 bis 4 h war eine Expressionsausbeute von 30 bis 35 mg pro Liter Medium erreicht. Die Zellen wurden bei 4°C für 15 min zentrifugiert (5000 rpm) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 30 ml Lysispuffer (20  $\text{mmol l}^{-1}$  Tris-HCl, 0.1% Triton X-100, pH 8.0) aufgenommen und am Hochdruckhomogenisator (*french press*) aufgeschlossen. Es wurde zentrifugiert (4°C, 22000 rpm, 20 min), das aus *inclusion bodies* bestehende Pellet in 12 ml Puffer (5  $\text{mol l}^{-1}$  GuHCl, 20  $\text{mmol l}^{-1}$  Tris-HCl, pH 7.5) aufgenommen und mittels Ultraschall im Eisbad homogenisiert. Es wurde zentrifugiert (4°C, 22000 rpm, 20 min) und der Überstand auf eine Konzentration von 1 bis 2 mg Protein/ml verdünnt. 20 mg des Proteins wurden 2 h mit TCEP bei RT reduziert und die Lösung über Nacht bei 8°C gegen denaturierenden Puffer dialysiert.

(5 mol l<sup>-1</sup> GuHCl, 1 mmol l<sup>-1</sup> EDTA, pH 3; MWCO 3500). Der Überstand wurde auf eine Konzentration von 0.5 mg Protein/ml verdünnt (5 mol l<sup>-1</sup> GuHCl, 1 mmol l<sup>-1</sup> EDTA) und der pH-Wert auf 7.5 eingestellt. Die Faltung des Rezeptor-N-Terminus erfolgte durch Dialyse für 3 d gegen wässrigen Puffer (1 M Arginin, 100 mM Tris, 1 mM EDTA, 1 mM reduziertes Gluthation, 1 mM oxidiertes Gluthation, pH 7.5 bei 10°C; MWCO 3500). Das gefaltete Protein wurde mittels RP-HPLC gereinigt (Vydac C4, 250×10 mm, 5 µm, 300 Å, linearer Gradient 20-60% B in 70 min, 10 ml min<sup>-1</sup>).

Ausbeute: 5.6 mg (aus 20 mg ungefaltetem Protein), HPLC: 96%, MALDI-MS *m/z*: ber. 13005.6, gef. 13007 ± 5.

### **3.2.29. Enzymatischer Verdau des CRF<sub>1</sub>-Rezeptor-N-Terminus zur Bestimmung des Disulfidmusters**

Zu 40 µl NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>-Puffer (50 mmol l<sup>-1</sup>, pH 7.5) wurden nacheinander 3.01 µl gefalteter Rezeptor-N-Terminus (0.5 mmol l<sup>-1</sup> in H<sub>2</sub>O) und 1.0 µl Chymotrypsin (0.5 g l<sup>-1</sup> in Salzsäure 1 mol l<sup>-1</sup>) gegeben. Nach 19 h schütteln bei RT wurden 15 µl der Probe mit 15 µl 0.6% TFA angesäuert und mittels LC-MS analysiert (linearer Gradient von 1 bis 35% B in 8 min). Die identifizierten Fragmente sind in Tabelle 8 und 9 angegeben (Seite 44 bzw. 45).

### **3.2.30. Sortase-vermittelte Ligation von ECD1-LPKTGGR und dem 3-Loop-Konstrukt 51**

Eine Mischung des gefalteten Rezeptor-N-Terminus ECD1-LPKTGGR (2.60 mg, 238 µmol l<sup>-1</sup>), 3-Loop-Konstrukt **51** (2.09 mg, 238 µmol l<sup>-1</sup>) und Sortase A (5.7 µmol l<sup>-1</sup>) gelöst in wässrigem Puffer (50 mmol l<sup>-1</sup> Tris-HCl, 150 mmol l<sup>-1</sup> NaCl, 5 mmol l<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>, 0.95 mol l<sup>-1</sup> Harnstoff, pH 7.5) wurde bei 23°C geschüttelt. Laut HPLC-Analyse betrug die Kupplungsausbeute nach 2 d ca. 60%. Das Rohprodukt wurde chromatographisch gereinigt (ProntoSIL C-18, 250×8 mm, 300 Å, 5 µm, linearer Gradient 30-80% B in 70 min, 2 ml min<sup>-1</sup>) und lyophilisiert.

Ausbeute: 1.678 mg (36%), HPLC: >99%, MALDI-MS *m/z*: ber. 23022, gef. 23020 ± 10.

### **3.2.31. Synthese von H-Gly-Gly-Gly-Lys(Dns)-NH<sub>2</sub> (52)**

Das Peptid wurde manuell gemäß der Standardvorschrift (3.2.2) synthetisiert. Der Lysinrest wurde als Fmoc-Lys(Dde)-OH, der N-terminale Glycinrest als Boc-Gly-OH eingeführt. Nach der Abspaltung der Dde-Gruppe mit 4 ml Hydrazin (2% in DMF) für

10 min wurde der Dansylrest wie in Abschnitt 3.2.7 beschrieben eingeführt. Nach der Abspaltung vom Harz mit 5% Wasser in TFA wurde das Produkt lyophilisiert.

HPLC: 96%, MALDI-MS  $m/z$ : ber. 549.237, gef. 549.233.

### 3.2.32. Fluoreszenzmarkierung von ECD1-LPKTGGR

20  $\mu$ l ECD1-LPKTGGR ( $1.0 \text{ mmol l}^{-1}$  in 30% DMSO/Puffer A), 20  $\mu$ l **52** ( $1.0 \text{ mmol l}^{-1}$  in Puffer A) und 20  $\mu$ l Sortase A ( $19 \mu\text{mol l}^{-1}$  in Puffer A) wurden bei 23°C geschüttelt. HPLC-Analyse ergab einen Umsatz von 59% nach 42 h.

### 3.2.33. Enzymatischer Verdau von NEMO mittels Trypsin

Zu 30  $\mu$ l  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ -Puffer ( $50 \text{ mmol l}^{-1}$ , pH 7.5) wurden nacheinander 5.0  $\mu$ l NEMO ( $0.5 \text{ mmol l}^{-1}$  in  $\text{H}_2\text{O}$ ) und 2.0  $\mu$ l Trypsin ( $0.2 \text{ g l}^{-1}$  in Salzsäure  $1 \text{ mol l}^{-1}$ ) gegeben. Nach 19 h schütteln bei RT wurden 15  $\mu$ l der Probe mit 10  $\mu$ l 0.6% TFA angesäuert und mittels LC-MS analysiert (linearer Gradient von 1 bis 35% B in 8 min). Die gefundenen Fragmente sind in Tabelle 16 dargestellt.



**Tabelle 16.** Gefundene lineare Fragmente nach Verdau des reduzierten NEMO mittels Trypsin.

Fragment	Sequenz	monoisotopische Abweichung		
		Masse ber.	Masse gef.	in ppm
5-8	HLWK	582.328	582.31	-25
9-54	SQLCEMVQPSGGPAADQD VLGEESPLGKPAMLHLPSE QGAPETLQR	4797.305	4797.22	-18
55-63	CLEENQELR	1132.518	1132.49	-22
64-67	DAIR	473.260	473.25	-24
68-74	QSNQILR	857.472	857.45	-26
75-88	ERCEELLHFQASQR	1744.832	1744.79	-24
77-88	CEELLHFQASQR	1459.688	1459.66	-17
89-97	EEKEFLMCK	1155.530	1155.51	-15
92-97	EFLMCK	769.350	769.33	-24
98-102	FQEAR	649.318	649.30	-21
104-107	LVER	515.307	515.30	-18
108-112	LGLEK	558.338	558.32	-28
113-116	LDLK	487.301	487.29	-25
118-124	QKEQALR	871.488	871.47	-19
120-124	EQALR	615.334	615.32	-16
125-130	EVEHLK	753.402	753.39	-19
125-131	EVEHLKR	909.503	909.49	-18
132-140	CQQQMAEDK	1079.438	1079.42	-17
141-144	ASVK	403.243	403.24	-18
145-160	AQVTSLLGELQESQSR	1744.896	1744.85	-28
161-166	LEAATK	631.354	631.34	-29
161-174	LEAATKECQALEGR	1517.751	1517.73	-16
167-174	ECQALEGR	904.407	904.38	-26
177-183	AASEQAR	731.356	731.34	-18
184-189	QLESER	760.372	760.35	-23
190-204	EALQQQHSVQVDQLR	1777.907	1777.86	-24
205-215	MQGQSVEAALR	1188.592	1188.57	-23
216-218	MER	434.195	434.19	-18
219-225	QAASEEK	761.356	761.34	-14

Fragment	Sequenz	monoisotopische Abweichung		
		Masse ber.	Masse gef.	in ppm
228-247	LAQLQVAYHQLFQEYDNHI	2457.244	2457.19	-21
	K			
248-255	SSVVGSER	819.409	819.39	-28
257-265	RGMQLEDLK	1088.565	1088.55	-12
258-265	GMQLEDLK	932.464	932.44	-24
266-278	QQLQQAEEALVAK	1454.773	1454.74	-20
279-284	QEVIDK	730.386	730.37	-19
285-293	LKEEAEQHK	1110.567	1110.55	-19
294-303	IVMETVPVLK	1127.662	1127.64	-22
304-310	AQADIYK	807.413	807.40	-20
311-317	ADFQAER	835.382	835.36	-21
321-326	EKLAEK	716.407	716.40	-15
323-326	LAEK	459.269	459.26	-15
327-339	KELLQEQLEQLQR	1653.905	1653.88	-17
328-339	ELLQEQLEQLQR	1525.810	1525.78	-19
340-343	EYSK	525.244	525.24	-12
346-353	ASCQESAR	850.360	850.35	-14
354-358	IEDMR	662.306	662.29	-23
361-386	HVEVSQAPLPPAPAYLSSP	2724.460	2724.40	-21
	LALPSQR			
387-400	RSPPEEPPDFCCPK	1600.701	1600.68	-14
388-400	SPPEEPPDFCCPK	1444.600	1444.58	-14
388-423	SPPEEPPDFCCPKCQYQA	4130.827	4130.73	-24
	PDMDTLQIHVMECIELPK			
401-423	CQYQAPDMDTLQIHVMECI	2704.237	2704.19	-19
	ELPK			
424-427	TGGR	389.202	389.20	-4
428-434	RHHHHHH	996.465	996.45	-17
429-434	HHHHHH	840.364	840.35	-13

### 3.2.34. C-terminale Dansylierung von NEMO mittels Sortase-vermittelter Ligation

Von in *E. coli* exprimiertem und mittels RP-HPLC gereinigtem NEMO wurde eine Stammlösung ( $0.5 \text{ mmol l}^{-1}$ ) in Wasser hergestellt. Zu  $140 \text{ }\mu\text{l}$  dieser Lösung wurden  $280 \text{ }\mu\text{l}$  Harnstoff ( $8 \text{ mol l}^{-1}$  in Wasser),  $420 \text{ }\mu\text{l}$  Dansylpeptid **52** ( $1.0 \text{ mmol l}^{-1}$  in Puffer A),  $830 \text{ }\mu\text{l}$  Puffer A und  $430 \text{ }\mu\text{l}$  Sortase A ( $12 \text{ }\mu\text{mol l}^{-1}$  in Puffer A) gegeben und 5 d bei RT geschüttelt. Die Lösung wurde vom Niederschlag abdekantiert und der Überstand auf  $1 \text{ ml}$  IMAC Harz gegeben. Es wurde filtriert und mit  $0.5 \text{ ml}$  Wasser gewaschen. Die vereinigten Eluate wurden mit  $200 \text{ }\mu\text{l}$   $0.1\%$ iger TFA angesäuert und über Nacht bei  $4^\circ\text{C}$  gegen  $0.1\%$ ige TFA dialysiert (MWCO 3500). Gefriertrocknung ergab  $1.16 \text{ mg}$  ( $34\%$ ) klebriges weißes Pulver, das mittels SDS-PAGE und tryptischem Verdau analysiert wurde.

### 3.2.35. Bestimmung der enzymatischen Aktivität in Gegenwart von Peptidylketoaldehyd-Inhibitoren

Es wurden  $5 \text{ }\mu\text{l}$  **5g** ( $1 \text{ mmol l}^{-1}$ ),  $5 \text{ }\mu\text{l}$  **6** ( $1 \text{ mmol l}^{-1}$ ),  $5 \text{ }\mu\text{l}$  Sortase A ( $1.6 \text{ }\mu\text{mol l}^{-1}$ ) und  $10 \text{ }\mu\text{l}$  Peptidylketoaldehyd **53** oder **54** ( $10, 5, 1, 0.5, 0.1, 0.05, 0.01$  oder  $0.00 \text{ mmol l}^{-1}$ ), jeweils gelöst in Puffer A, für 4 h geschüttelt. Es wurde wie in Abschnitt 3.2.14 beschrieben sauer aufgearbeitet und mittels HPLC analysiert.

#### 4. Literaturverzeichnis

- [1] A. Cornishbowden, *Eur. J. Biochem.* **1984**, 138(1), 9-37.
- [2] Übersichtsartikel: (a) N. Budisa, *Angew. Chem.* **2004**, 116(47), 6586-6624; (b) P. M. England, *Biochemistry* **2004**, 43(37), 11623-11629; (c) L. Wang, P. G. Schultz, *Chem. Commun.* **2002**, (1), 1-11.
- [3] R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85(14), 2149-2154.
- [4] M. Goodman, A. Felix, L. Moroder, C. Toniolo (Eds.), *Houben-Weyl, Methods of Organic Chemistry: Synthesis of Peptides and Peptidomimetics*, Vol. 22a, Georg Thieme Verlag: Stuttgart, **2002**.
- [5] E. Bayer, *Angew. Chem.* **1991**, 103(2), 117-133.
- [6] Übersichtsartikel: S. Sakakibara, *Biopolymers* **1999**, 51(4), 279-296.
- [7] Y. Nishiuchi, T. Inui, H. Nishio, J. Bodi, T. Kimura, F. I. Tsuji, S. Sakakibara, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1998**, 95(23), 13549-13554.
- [8] Übersichtsartikel: M. R. Pratt, T. W. Muir, P. E. Dawson, M. B. Francis, in *Chemical Biology*, Vol. 2, Eds.: S. L. Schreiber, T. M. Kapoor, G. Wess, WILEY-VCH: Weinheim, **2007**, S. 537-634.
- [9] Übersichtsartikel zu chemischen Methoden der Amidbildung: J. W. Bode, *Curr. Opin. Drug Discovery Dev.* **2006**, 9(6), 765-775.
- [10] K. Rose, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116(1), 30-33.
- [11] H. F. Gaertner, R. E. Offord, R. Cotton, D. Timms, R. Camble, K. Rose, *J. Biol. Chem.* **1994**, 269(10), 7224-7230.
- [12] M. Schnölzer, S. B. H. Kent, *Science* **1992**, 256(5054), 221-225.
- [13] S. Sato, Y. Kwon, S. Kamisuki, N. Srivastava, Q. Mao, Y. Kawazoe, M. Uesugi, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129(4), 873-880.
- [14] D. R. Englebrechtsen, B. G. Garnham, D. A. Bergman, P. F. Alewood, *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36(48), 8871-8874.
- [15] (a) A. D. de Araújo, J. M. Palomo, J. Cramer, M. Kohn, H. Schroder, R. Wacker, C. Niemeyer, K. Alexandrov, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **2005**, 118(2), 302-307; (b) A. D. de Araújo, J. M. Palomo, J. Cramer, O. Seitz, K. Alexandrov, H. Waldmann, *Chem. Eur. J.* **2006**, 12(23), 6095-6109.
- [16] Übersichtsartikel: H. C. Kolb, K. B. Sharpless, *Drug Discovery Today* **2003**, 8(24), 1128-1137.
- [17] P. E. Dawson, T. W. Muir, I. Clark-Lewis, S. B. H. Kent, *Science* **1994**, 266(5186), 776-779.

- [18] G. G. Kochendoerfer, S. Y. Chen, F. Mao, S. Cressman, S. Traviglia, H. Shao, C. L. Hunter, D. W. Low, E. N. Cagle, M. Carnevali, V. Gueriguian, P. J. Keogh, H. Porter, S. M. Stratton, M. C. Wiedeke, J. Wilken, J. Tang, J. J. Levy, L. P. Miranda, M. M. Crnogorac, S. Kalbag, P. Botti, J. Schindler-Horvat, L. Savatski, J. W. Adamson, A. Kung, S. B. H. Kent, J. A. Bradburne, *Science* **2003**, 299(5608), 884-887.
- [19] C. Chatterjee, R. K. McGinty, J. P. Pellois, T. W. Muir, *Angew. Chem.* **2007**, 119(16), 2872-2876.
- [20] Übersichtsartikel u. a. zu Thiolhilfsgruppen bei der NCL: D. Macmillan, *Angew. Chem.* **2006**, 118(46), 7830-3834.
- [21] T. W. Muir, D. Sondhi, P. A. Cole, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1998**, 95(12), 6705-6710.
- [22] Übersichtsartikel: T. W. Muir, *Annu. Rev. Biochem.* **2003**, 72, 249-289.
- [23] I. Gariat, T. W. Muir, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125(24), 7180-7181.
- [24] C. Ludwig, M. Pfeiff, U. Linne, H. D. Mootz, *Angew. Chem.* **2006**, 118(31), 5343-5347.
- [25] (a) E. Saxon, J. I. Armstrong, C. R. Bertozzi, *Org. Lett.* **2000**, 2(14), 2141-2143; (b) B. L. Nilsson, R. J. Hondal, M. B. Soellner, R. T. Raines, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125(18), 5268-5269.
- [26] R. Merx, D. T. S. Rijkers, J. Kemmink, R. M. J. Liskamp, *Tetrahedron Lett.* **2003**, 44(24), 4515-4518.
- [27] J. W. Bode, R. M. Fox, K. D. Baucom, *Angew. Chem.* **2006**, 118(8), 1270-1274.
- [28] Übersichtsartikel: M. Mutter, S. Vuilleumier, *Angew. Chem.* **1989**, 101(5), 551-571.
- [29] (a) G. G. Tuchscherer, C. Lehmann, M. Mathieu, *Angew. Chem.* **1998**, 110(21), 3160-3164; (b) M. Mutter, G. G. Tuchscherer, C. Miller, K. H. Altmann, R. I. Carey, D. F. Wyss, A. M. Labhardt, J. E. Rivier, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114(4), 1463-1470.
- [30] (a) E. Katz, V. Heleg-Shabtai, I. Willner, H. K. Rau, W. Haehnel, *Angew. Chem.* **1998**, 110(23), 3443-3447; (b) H. K. Rau, W. Haehnel, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120(3), 468-476.
- [31] M. Montal, M. S. Montal, J. M. Tomich, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1990**, 87(18), 6929-6933.
- [32] N. Sewald, H.-D. Jakubke, *Peptides: Chemistry and Biology*, WILEY-VCH: Weinheim, **2002**, S. 247-267.

- [33] Übersichtsartikel: (a) F. Bordusa, H.-D. Jakubke, in *Houben-Weyl, Methods of Organic Chemistry: Synthesis of Peptides and Peptidomimetics*, Vol. E22a, Eds.: M. Goodman, A. Felix, L. Moroder, C. Toniolo, Georg Thieme Verlag: Stuttgart, **2002**, S. 642-664; (b) F. Bordusa, *Chem. Rev.* **2002**, 102(12), 4817-4867; (c) C. Lombard, J. Saulnier, J. M. Wallach, *Protein Pept. Lett.* **2005**, 12(7), 621-629; (d) S. Pritz, *Mini. Rev. Org. Chem.* **2008**, 5(1), 47-52.
- [34] (a) I. Schechter, A. Berger, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1967**, 27(2), 157-162; (b) I. Schechter, A. Berger, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1968**, 32(5), 898-902.
- [35] F. Bordusa, D. Ullmann, H.-D. Jakubke, *Angew. Chem.* **1997**, 109(10), 1125-1127.
- [36] F. Bordusa, D. Ullmann, C. Elsner, H.-D. Jakubke, *Angew. Chem.* **1997**, 109(22), 2583-2585.
- [37] N. Wehofsky, N. Koglin, S. Thust, F. Bordusa, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125(20), 6126-6133.
- [38] Z. Machova, R. von Eggelkraut-Gottanka, N. Wehofsky, F. Bordusa, A. G. Beck-Sickinger, *Angew. Chem.* **2003**, 115(40), 5065-5067.
- [39] D. Y. Jackson, J. Burnier, C. Quan, M. Stanley, J. Tom, J. A. Wells, *Science* **1994**, 266(5183), 243-247.
- [40] T. K. Chang, D. Y. Jackson, J. P. Burnier, J. A. Wells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1994**, 91(26), 12544-12548.
- [41] L. Abrahmsén, J. Tom, J. Burnier, K. A. Butcher, A. Kossiakoff, J. A. Wells, *Biochemistry* **1991**, 30(17), 4151-4159.
- [42] Kürzlich erschienene Übersichtsartikel über Sortasen: L. A. Marraffini, A. C. DeDent, O. Schneewind, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2006**, 70(1), 192-221.
- [43] H. Ton-That, G. Liu, S. K. Mazmanian, K. F. Faull, O. Schneewind, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1999**, 96(22), 12424-12429.
- [44] S. K. Mazmanian, G. Liu, H. Ton-That, O. Schneewind, *Science* **1999**, 285(5428), 760-763.
- [45] (a) A. M. Perry, H. Ton-That, S. K. Mazmanian, O. Schneewind, *J. Biol. Chem.* **2002**, 277(18), 16241-16248; (b) A. Ruzin, A. Severin, F. Ritacco, K. Tabei, G. Singh, P. A. Bradford, M. M. Siegel, S. J. Projan, D. M. Shlaes, *J. Bacteriol.* **2002**, 184(8), 2141-2147.
- [46] Übersichtsartikel zur Synthese von Pili: H. Ton-That, O. Schneewind, *Trends Microbiol.* **2004**, 12(5), 228-234.

- [47] (a) H. Ton-That, O. Schneewind, *Mol. Microbiol.* **2003**, 50(4), 1429-1438; (b) J. LeMieux, D. L. Hava, A. Basset, A. Camilli, *Infect. Immun.* **2006**, 74(4), 2453-2456; (c) A. Swierczynski, H. Ton-That, *J. Bacteriol.* **2006**, 188(17), 6318-6325.
- [48] Übersichtsartikel: A. W. Maresso, O. Schneewind, *Biometals* **2006**, 19(2), 193-203.
- [49] (a) S. K. Mazmanian, H. Ton-That, K. Su, O. Schneewind, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2002**, 99(4), 2293-2298; (b) S. K. Mazmanian, E. P. Skaar, A. H. Gaspar, M. Humayun, P. Gornicki, J. Jelenska, A. Joachmiak, D. M. Missiakas, O. Schneewind, *Science* **2003**, 299(5608), 906-909; (c) A. W. Maresso, T. J. Chapa, O. Schneewind, *J. Bacteriol.* **2006**, 188(23), 8145-8152.
- [50] H. Ton-That, L. A. Marraffini, O. Schneewind, *Biochim. Biophys. Acta* **2004**, 1694(1-3), 269-278.
- [51] M. J. Pallen, A. C. Lam, M. Antonio, K. Dunbar, *Trends Microbiol.* **2001**, 9(3), 97-101.
- [52] S. Dramsi, P. Trieu-Cuot, H. Bierne, *Res. Microbiol.* **2005**, 156(3), 289-297.
- [53] L. A. Marraffini, O. Schneewind, *J. Biol. Chem.* **2005**, 280(16), 16263-16271.
- [54] Übersichtsartikel: G. K. Paterson, T. J. Mitchell, *Trends Microbiol.* **2004**, 12(2), 89-95.
- [55] (a) S. K. Mazmanian, G. Liu, E. R. Jensen, E. Lenoy, O. Schneewind, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2000**, 97(10), 5510-5515; (b) I. M. Jonsson, S. K. Mazmanian, O. Schneewind, M. Verdrengh, T. Bremell, A. Tarkowski, *J. Infect. Dis.* **2002**, 185(10), 1417-1424; (c) I. M. Jonsson, S. K. Mazmanian, O. Schneewind, T. Bremell, A. Tarkowski, *Microbes Infect.* **2003**, 5(9), 775-780; (d) W. J. Weiss, E. Lenoy, T. Murphy, L. Tardio, P. Burgio, S. J. Projan, O. Schneewind, L. Alksne, *J. Antimicrob. Chemother.* **2004**, 53(3), 480-486; (e) A. C. Schaffer, R. M. Solinga, J. Cocchiaro, M. Portoles, K. B. Kiser, A. Risley, S. M. Randall, V. Valtulina, P. Speziale, E. Walsh, T. Foster, J. C. Lee, *Infect. Immun.* **2006**, 74(4), 2145-2153.
- [56] (a) D. L. Hava, A. Camilli, *Mol. Microbiol.* **2002**, 45(5), 1389-1405; (b) G. K. Paterson, T. J. Mitchell, *Microbes Infect.* **2006**, 8(1), 145-153.
- [57] S. F. Lee, T. L. Boran, *Infect. Immun.* **2003**, 71(2), 676-681.
- [58] T. C. Bolken, C. A. Franke, K. F. Jones, G. O. Zeller, C. H. Jones, E. K. Dutton, D. E. Hruby, *Infect. Immun.* **2001**, 69(1), 75-80.
- [59] L. Lalioui, E. Pellegrini, S. Dramsi, M. Baptista, N. Bourgeois, F. Doucet-Populaire, C. Rusniok, M. Zouine, P. Glaser, F. Kunst, C. Poyart, P. Trieu-Cuot, *Infect. Immun.* **2005**, 73(6), 3342-3350.

- [60] (a) H. Bierne, S. K. Mazmanian, M. Trost, M. G. Pucciarelli, G. Liu, P. Dehoux, the European Listeria Genome Consortium, L. Jänsch, F. Garcia-del Portillo, O. Schneewind, P. Cossart, *Mol. Microbiol.* **2002**, 43(4), 869-881; (b) C. Garandeau, H. Réglie-Poupet, L. Dubail, J. L. Beretti, the European Listeria Genome Consortium, P. Berche, A. Charbit, *Infect. Immun.* **2002**, 70(3), 1382-1390; (c) C. Sabet, M. Lecuit, D. Cabanes, P. Cossart, H. N. Bierne, *Infect. Immun.* **2005**, 73(10), 6912-6922.
- [61] Übersichtsartikel: (a) P. Cossart, R. Jonquieres, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2000**, 97(10), 5013-5015; (b) C. T. Supuran, A. Scozzafava, B. W. Clare, *Med. Res. Rev.* **2002**, 22(4), 329-372; (c) H. Yoneyama, R. Katsumata, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2006**, 70(5), 1060-1075; (d) N. Suree, M. E. Jung, R. T. Clubb, *Mini. Rev. Med. Chem.* **2007**, 7(10), 991-1000.
- [62] H. Ton-That, O. Schneewind, *J. Biol. Chem.* **1999**, 274(34), 24316-24320.
- [63] S. W. Kim, I. M. Chang, K. B. Oh, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2002**, 66(12), 2751-2754.
- [64] S. H. Kim, D. S. Shin, M. N. Oh, S. C. Chung, J. S. Lee, I. M. Chang, K. B. Oh, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2003**, 67(11), 2477-2479.
- [65] S. H. Kim, D. S. Shin, M. N. Oh, S. C. Chung, J. S. Lee, K. B. Oh, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2004**, 68(2), 421-424.
- [66] B. S. Park, J. G. Kim, M. R. Kim, S. E. Lee, G. R. Takeoka, K. B. Oh, J. H. Kim, *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53(23), 9005-9009.
- [67] K. B. Oh, W. Mar, S. Kim, J. Y. Kim, M. N. Oh, J. G. Kim, D. Shin, C. J. Sim, J. Shin, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, 15(22), 4927-4931.
- [68] K. B. Oh, M. N. Oh, J. G. Kim, D. S. Shin, J. Shin, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, 70(1), 102-106.
- [69] S. S. Kang, J. G. Kim, T. H. Lee, K. B. Oh, *Biol. Pharm. Bull.* **2006**, 29(8), 1751-1755.
- [70] K. H. Jang, S. C. Chung, J. Shin, S. H. Lee, T. I. Kim, H. S. Lee, K. B. Oh, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, 17(19), 5366-5369.
- [71] B. A. Frankel, M. Bentley, R. G. Kruger, D. G. McCafferty, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126(11), 3404-3405.
- [72] K. B. Oh, S. H. Kim, J. Lee, W. J. Cho, T. Lee, S. Kim, *J. Med. Chem.* **2004**, 47(10), 2418-2421.



- [73] A. W. Maresso, R. Y. Wu, J. W. Kern, R. G. Zhang, D. Janik, D. M. Missiakas, M. E. Duban, A. Joachimiak, O. Schneewind, *J. Biol. Chem.* **2007**, 282(32), 23129-23139.
- [74] C. J. Scott, A. McDowell, S. L. Martin, J. F. Lynas, K. Vandenbroeck, B. Walker, *Biochem. J.* **2002**, 366, 953-958.
- [75] K. M. Connolly, B. T. Smith, R. Pilpa, U. Ilangovan, M. E. Jung, R. T. Clubb, *J. Biol. Chem.* **2003**, 278(36), 34061-34065.
- [76] R. G. Kruger, S. Barkallah, B. A. Frankel, D. G. McCafferty, *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, 12(13), 3723-3729.
- [77] Eine Einführung in die Enzymkinetik findet sich in: D. Voet, J. G. Voet, C. W. Pratt, *Lehrbuch der Biochemie*, WILEY-VCH: Weinheim, **2002**, S. 341-369; zu Ping-Pong-Reaktionen, S. 354.
- [78] B. A. Frankel, R. G. Kruger, D. E. Robinson, N. L. Kelleher, D. G. McCafferty, *Biochemistry* **2005**, 44(33), 11188-11200.
- [79] X. Huang, A. Aulabaugh, W. Ding, B. Kapoor, L. Alksne, K. Tabei, G. Ellestad, *Biochemistry* **2003**, 42(38), 11307-11315.
- [80] U. Ilangovan, H. Ton-That, J. Iwahara, O. Schneewind, R. T. Clubb, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2001**, 98(11), 6056-6061.
- [81] Y. N. Zong, T. W. Bice, H. Ton-That, O. Schneewind, S. V. L. Narayana, *J. Biol. Chem.* **2004**, 279(30), 31383-31389.
- [82] (a) B. A. Frankel, Y. Tong, M. L. Bentley, M. C. Fitzgerald, D. G. McCafferty, *Biochemistry* **2007**, 46(24), 7269-7278; (b) M. L. Bentley, H. Gaweska, J. M. Kielec, D. G. McCafferty, *J. Biol. Chem.* **2007**, 282(9), 6571-6581.
- [83] R. G. Kruger, B. Otvos, B. A. Frankel, M. Bentley, P. Dostal, D. G. McCafferty, *Biochemistry* **2004**, 43(6), 1541-1551.
- [84] H. Y. Mao, S. A. Hart, A. Schink, B. A. Pollok, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126(9), 2670-2671.
- [85] M. T. Naik, N. Suree, U. Ilangovan, C. K. Liew, W. Thieu, D. O. Campbell, J. J. Clemens, M. E. Jung, R. T. Clubb, *J. Biol. Chem.* **2006**, 281(3), 1817-1826.
- [86] C. S. Lu, J. Zhu, Y. Wang, A. Umeda, R. B. Cowmeadow, E. Lai, G. N. Moreno, M. D. Person, Z. W. Zhang, *Biochemistry* **2007**, 46(32), 9346-9354.
- [87] S. Pritz, Y. Wolf, O. Kraetke, J. Klose, M. Bienert, M. Beyermann, *J. Org. Chem.* **2007**, 72(10), 3909-3912.
- [88] <http://www.doe-mbi.ucla.edu/Services/Sortase>. Datenbanksuche für Sortase A-Substrate am 3.11.2006.

- [89] D. Comfort, R. T. Clubb, *Infect. Immun.* **2004**, 72(5), 2710-2722.
- [90] (a) V. A. Fischetti, V. Pancholi, O. Schneewind, *Mol. Microbiol.* **1990**, 4(9), 1603-1605; (b) R. Janulczyk, M. Rasmussen, *Infect. Immun.* **2001**, 69(6), 4019-4026; (c) J. Boekhorst, M. W. H. J. De Been, M. Kleerebezem, R. J. Siezen, *J. Bacteriol.* **2005**, 187(14), 4928-4934.
- [91] G. Dhar, K. F. Faull, O. Schneewind, *Biochemistry* **2000**, 39(13), 3725-3733.
- [92] H. Ton-That, H. Labischinski, B. Berger-Bächi, O. Schneewind, *J. Biol. Chem.* **1998**, 273(44), 29143-29149.
- [93] R. Parthasarathy, S. Subramanian, E. T. Boder, *Bioconjug. Chem.* **2007**, 18(2), 469-476.
- [94] R. G. Kruger, P. Dostal, D. G. McCafferty, *Chem. Commun.* **2002**, 2092-2093.
- [95] Übersichtsartikel: K. N. Ganesh, P. E. Nielsen, *Curr. Org. Chem.* **2000**, 4(9), 931-943.
- [96] (a) M. Egholm, O. Buchardt, L. Christensen, C. Behrens, S. M. Freier, D. A. Driver, R. H. Berg, S. K. Kim, B. Norden, P. E. Nielsen, *Nature* **1993**, 365(6446), 566-568; (b) Ö. Almarsson, T. C. Bruice, J. Kerr, R. N. Zuckermann, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1993**, 90(16), 7518-7522.
- [97] S. Tomac, M. Sarkar, T. Ratilainen, P. Wittung, P. E. Nielsen, B. Nordén, A. Gräslund, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118(24), 5544-5552.
- [98] V. V. Demidov, V. N. Potaman, M. D. Frank-Kamenetskii, M. Egholm, O. Buchard, S. H. Sonnichsen, P. E. Nielsen, *Biochem. Pharmacol.* **1994**, 48(6), 1310-1313.
- [99] Übersichtsartikel: P. E. Nielsen, *Curr. Opin. Biotechnol.* **1999**, 10(1), 71-75.
- [100] Übersichtsartikel: Z. V. Zhilina, A. J. Ziemba, S. W. Ebbinghaus, *Curr. Top. Med. Chem.* **2005**, 5(12), 1119-1131.
- [101] Übersichtsartikel: (a) E. L. Snyder, S. F. Dowdy, *Pharm. Res.* **2004**, 21(3), 389-393; (b) M. Zorko, Ü. Langel, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2005**, 57(4), 529-545; (c) Ü. Langel (Ed.), *Handbook of Cell-Penetrating Peptides*, 2nd ed., CRC Press: Boca Raton, **2006**.
- [102] (a) M. Pooga, U. Soomets, M. Hällbrink, A. Valkna, K. Saar, K. Rezaei, U. Kahl, J. X. Hao, X. J. Xu, Z. Wiesenfeld-Hallin, T. Hökfelt, A. Bartfai, Ü. Langel, *Nat. Biotechnol.* **1998**, 16(9), 857-861; (b) J. Oehlke, G. Wallukat, Y. Wolf, A. Ehrlich, B. Wiesner, H. Berger, M. Bienert, *Eur. J. Biochem.* **2004**, 271(14), 3043-3049; (c) S. Abes, D. Williams, P. Prevot, A. Thierry, M. J. Gait, B. Lebleu, *J. Controlled Release* **2006**, 110(3), 595-604.

- [103] Übersichtsartikel: N. Venkatesan, B. H. Kim, *Chem. Rev.* **2006**, 106(9), 3712-3761.
- [104] S. Pritz, Y. Wolf, C. Klemm, M. Bienert, *Tetrahedron Lett.* **2006**, 47(33), 5893-5896.
- [105] T. Koch, H. F. Hansen, P. Andersen, T. Larsen, H. G. Batz, K. Otteson, H. Orum, *J. Pept. Res.* **1997**, 49(1), 80-88.
- [106] K. L. Dueholm, M. Egholm, C. Behrens, L. Christensen, H. F. Hansen, T. Vulpus, K. H. Petersen, R. H. Berg, P. E. Nielsen, O. Buchardt, *J. Org. Chem.* **1994**, 59(19), 5767-5773.
- [107] T. Kofoed, H. F. Hansen, H. Orum, T. Koch, *J. Peptide Sci.* **2001**, 7(8), 402-412.
- [108] J. Weiler, H. Gausepohl, N. Hauser, O. N. Jensen, J. D. Hoheisel, *Nucleic Acids Res.* **1997**, 25(14), 2792-2799.
- [109] O. Seitz, O. Köhler, *Chem. Eur. J.* **2001**, 7(18), 3911-3925.
- [110] S. A. Thomson, J. A. Josey, R. Cadilla, M. D. Gaul, C. F. Hassman, M. J. Luzzio, A. J. Pipe, K. L. Reed, D. J. Ricca, R. W. Wiethe, S. A. Noble, *Tetrahedron* **1995**, 51(22), 6179-6194.
- [111] E. Ferrer, M. Eisenhut, R. Eritja, *Lett. Pept. Sci.* **1999**, 6(4), 209-219.
- [112] (a) L. A. Carpino, H. Imazumi, A. El-Faham, F. J. Ferrer, C. W. Zhang, Y. S. Lee, B. M. Foxman, P. Henklein, C. Hanay, C. Mügge, H. Wenschuh, J. Klose, M. Beyermann, M. Bienert, *Angew. Chem.* **2002**, 114(3), 457-461; (b) L. A. Carpino, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115(10), 4397-4398.
- [113] J. Coste, D. Lenguyen, B. Castro, *Tetrahedron Lett.* **1990**, 31(2), 205-208.
- [114] Synthesen mit HATU: (a) Lit.<sup>[107]</sup>; (b) Lit.<sup>[105]</sup>; (c) T. E. Goodwin, R. D. Holland, J. O. Lay, K. D. Raney, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, 8(16), 2231-2234; (d) E. Lioy, H. Kessler, *Liebigs Annalen* **1996**, 201-204; (e) G. Kovács, Z. Timár, Z. Kupihár, Z. Kele, L. Kovács, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **2002**, (10), 1266-1270; (f) L. D. Mayfield, D. R. Corey, *Anal. Biochem.* **1999**, 268(2), 401-404; (g) O. Brandt, J. Feldner, A. Stephan, M. Schröder, M. Schnölzer, H. F. Arlinghaus, J. D. Hoheisel, A. Jacob, *Nucleic Acids Res.* **2003**, 31(19), e119.
- Synthesen mit PyBOP: (h) J. J. Turner, G. D. Ivanova, B. Verbeure, D. Williams, A. A. Arzumanov, S. Abes, B. Lebleu, M. J. Gait, *Nucleic Acids Res.* **2005**, 33(21), 6837-6849; (i) D. W. Will, D. Langner, J. Knolle, E. Uhlmann, *Tetrahedron* **1995**, 51(44), 12069-12082.
- Synthesen HATU und PyBOP: (j) S. Ficht, A. Mattes, O. Seitz, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126(32), 9970-9981; (k) L. Christensen, R. Fitzpatrick, B. Gildea, K. H.

- Petersen, H. F. Hansen, T. Koch, M. Egholm, O. Buchardt, P. E. Nielsen, J. Coull, O. Buchardt, R. H. Berg, *J. Peptide Sci.* **1995**, 1(3), 175-183.
- [115] H. Gausepohl, U. Piesles, R. W. Frank, in *Peptides, Chemistry and Biology*; Eds.: J. A. Smith, J. E. Rivier, ESCOM: Leiden, **1992**, S. 523-524.
- [116] T. Koch, in *Peptide Nucleic Acids: Protocols and Applications*, Eds.: P. E. Nielsen, M. Egholm, Horizon Scientific Press: Norfolk, **1999**, S. 21-37.
- [117] J. Coste, in *Houben-Weyl, Methods of Organic Chemistry: Synthesis of Peptides and Peptidomimetics, Vol. E22a*, Eds.: M. Goodman, A. Felix, L. Moroder, C. Toniolo, Georg Thieme Verlag: Stuttgart, **2002**, S. 538-554.
- [118] Z. K. Wan, S. Wacharasindhu, C. G. Levins, M. Lin, K. Tabei, T. S. Mansour, *J. Org. Chem.* **2007**, 72(26), 10194-10210.
- [119] A. Keppler, S. Gendreizig, T. Gronemeyer, H. Pick, H. Vogel, K. Johnsson, *Nat. Biotechnol.* **2003**, 21(1), 86-89.
- [120] A. Scheller, J. Oehlke, B. Wiesner, M. Dathe, E. Krause, M. Beyermann, M. Melzig, M. Bienert, *J. Pep. Sci.* **1999**, 5(4), 185-194.
- [121] S. H. Kang, M. J. Cho, R. Kole, *Biochemistry* **1998**, 37(18), 6235-6239.
- [122] Y. Wolf, S. Pritz, S. Abes, M. Bienert, B. Lebleu, J. Oehlke, *Biochemistry* **2006**, 45(50), 14944-14954.
- [123] N. Bendifallah, F. W. Rasmussen, V. Zachar, P. Ebbesen, P. E. Nielsen, U. Koppelhus, *Bioconjug. Chem.* **2006**, 17(3), 750-758.
- [124] S. Pritz, O. Kraetke, A. Klose, J. Klose, S. Rothmund, K. Fechner, M. Bienert, M. Beyermann, *Angew. Chem.* **2008**, 120, 3698-3701.
- [125] J. Drews, *Science* **2000**, 287(5460), 1960-1964.
- [126] M. H. Perrin, W. H. Fischer, K. S. Kunitake, A. G. Craig, S. C. Koerber, L. A. Cervini, J. E. Rivier, J. C. Groppe, J. Greenwald, S. M. Nielsen, W. W. Vale, *J. Biol. Chem.* **2001**, 276(34), 31528-31534.
- [127] J. Klose, K. Fechner, M. Beyermann, E. Krause, N. Wendt, M. Bienert, R. Rudolph, S. Rothmund, *Biochemistry* **2005**, 44(5), 1614-1623.
- [128] J. Vaughan, C. Donaldson, J. Bittencourt, M. H. Perrin, K. Lewis, S. Sutton, R. Chan, A. V. Turnbull, D. Lovejoy, C. Rivier, *Nature* **1995**, 378(6554), 287-292.
- [129] L. J. Qi, A. T. Leung, Y. Xiong, K. A. Marx, A. B. Abou-Samra, *Biochemistry* **1997**, 36(41), 12442-12448.
- [130] M. Mutter, P. Dumy, P. Garrouste, C. Lehmann, M. Mathieu, C. Peggion, S. Peluso, A. Razaname, G. Tuchscherer, *Angew. Chem.* **1996**, 108(13-14), 1588-1591

- 
- [131] M. Beyermann, N. Heinrich, K. Fechner, J. Furkert, W. Zhang, O. Kraetke, M. Bienert, H. Berger, *Br. J. Pharmacol.* **2007**, 151(6), 851-859.
- [132] A. Iakovenko, E. Rostkova, E. Merzlyak, A. M. Hillebrand, N. H. Thomä, R. S. Goody, K. Alexandrov, *FEBS Lett.* **2000**, 468(2-3), 155-158.
- [133] Übersichtsartikel: (a) T. D. Gilmore, *Oncogene* **2006**, 25(51), 6680-6684; (b) N. D. Perkins, *Oncogene* **2006**, 25(51), 6717-6730.
- [134] M. Herscovitch, W. Comb, T. Ennis, K. Coleman, S. Yong, B. Armstead, D. Kalaitzidis, S. Chandani, T. D. Gilmore, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2008**, 367(1), 103-108.
- [135] M. W. Popp, J. M. Antos, G. M. Grotenbreg, E. Spooner, H. L. Ploegh, *Nat. Chem. Biol.* **2007**, 3(11), 707-708.
- [136] (a) B. Walker, N. McCarthy, A. Healy, T. Ye, M. A. McKerverey, *Biochem. J.* **1993**, 293(2), 321-323; (b) J. F. Lynas, S. L. Martin, B. Walker, *J. Pharm. Pharmacol.* **2001**, 53(4), 473-480.
- [137] A. El-Dahshan, S. Weik, J. Rademann, *Org. Lett.* **2007**, 9(6), 949-952.
- [138] E. G. Zoetendal, H. G. Heilig, E. S. Klaassens, C. C. Booijink, M. Kleerebezem, H. Smidt, W. M. de Vos, *Nat. Protoc.* **2006**, 1(2), 870-873.
- [139] M. M. Bradford, *Anal. Biochem.* **1976**, 72, 248-254.

## 5. Anhang

### **Publikationen**

#### *Artikel in referierten Zeitschriften*

- S. Pritz, Y. Wolf, C. Klemm, M. Bienert: „Modification of guanine residues in PNA-synthesis by PyBOP“, *Tetrahedron Lett.* **2006**, 47(33), 5893-5896.
- Y. Wolf, S. Pritz, S. Abes, M. Bienert, B. Lebleu, J. Oehlke: „Structural requirements for cellular uptake and antisense activity of peptide nucleic acids conjugated with various peptides“, *Biochemistry* **2006**, 45(50), 14944-14954.
- S. Pritz, Y. Wolf, O. Kraetke, J. Klose, M. Bienert, M. Beyermann: „Synthesis of biologically active Peptide nucleic Acid-Peptide conjugates by sortase-mediated ligation“, *J. Org. Chem.* **2007**, 72(10), 3909-3912.
- S. Pritz, M. Pätzelt, G. Szeimies, M. Dathe, M. Bienert: „Synthesis of a chiral amino acid with bicyclo[1.1.1]pentane moiety and its incorporation into linear and cyclic antimicrobial peptides“, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, 5, 1789-1794.
- S. Pritz: „Enzymes in protein ligation: the coupling of peptides, peptide nucleic acids and proteins by sortase A“, *Mini. Rev. Org. Chem.* **2008**, 5(1), 47-52.
- S. Pritz, O. Kraetke, A. Klose, J. Klose, S. Rothmund, K. Fechner, M. Bienert, M. Beyermann: „Synthesis of Protein Mimics with Non-Linear Backbone Topology by Combined Recombinant, Enzymatic and Chemical Synthesis (CRECS) Strategy“, *Angew. Chem.* **2008**, 120, 3698-3701.

#### *Artikel in Konferenzbänden*

- S. Pritz, Y. Wolf, C. Klemm, M. Bienert: „A PyBOP induced side-reaction in PNA synthesis“, in *Peptides 2006*, Eds.: K. Rolka, P. Rekowski, J. Silberring, Kenes International: Genf, **2007**, S. 472-473.
- S. Pritz, Y. Wolf, O. Kraetke, J. Klose, M. Bienert, M. Beyermann: „Synthesis of Biologically Active Peptide-PNA Conjugates and Artificial Receptors by Sortase-Mediated Ligation“, in *Peptides 2006*, Eds.: K. Rolka, P. Rekowski, J. Silberring, Kenes International: Genf, **2007**, S. 468-469.
- S. Pritz, Y. Wolf, O. Kraetke, J. Klose, M. Bienert, M. Beyermann: „Enzymatic ligation of peptides, peptide nucleic acids and proteins by means of sortase A“, (*Proceedings of the 20<sup>th</sup> American Peptide Symposium*), im Druck.

### *Buchbeiträge*

M. Pätzelt, S. Pritz, J. Liebscher: „ $\alpha$ -Heteroatom-Substituted Alkanamides“, in *Science of Synthesis Houben–Weyl Methods of Molecular Transformations*, Vol. 21, Volume Editor: S. Weinreb, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **2005**, S. 477-535.

### *Konferenzbeiträge*

#### *Vorträge*

„Sortase-mediated Ligation“: EC framework 5 meeting, 1. April 2005, Cambridge, Großbritannien.

„Optimising the Sortase-mediated Ligation“: EC framework 5 meeting, 21. Oktober 2005, Berlin, Deutschland.

„Enzymatic ligation of peptides, PNAs and proteins by means of sortase A“: 8<sup>th</sup> German Peptide Symposium, 14.03.-17.03.2007, Heidelberg, Deutschland.

#### *Posterbeiträge auf internationalen Konferenzen*

M. Pätzelt, A. Doss, S. Pritz, G. Szeimies, C. Mügge, L. Grubert, P. Henklein: „Novel Amino Acids with Bicyclo[1.1.1]pentane Moiety and Their Incorporation into Peptides“, 6<sup>th</sup> German Peptide Symposium, 23.-26.03.2003, Berlin, Deutschland.

S. Pritz, H. Nikolenko, M. Pätzelt, G. Szeimies, M. Dathe and M. Bienert: „Synthesis of a Chiral Amino Acid with Bicyclo[1.1.1]pentane Moiety and its Incorporation into Linear and Cyclic Peptides“, 7<sup>th</sup> German Peptide Symposium, 27.02.-02.03.2005, Braunschweig, Deutschland.

S. Pritz, Y. Wolf, C. Klemm, M. Bienert: „Modification of Guanine Residues in PNA-Synthesis by PyBOP“, 29<sup>th</sup> European Peptide Symposium, 03.-08.09.2006, Gdansk, Polen.

S. Pritz, Y. Wolf, O. Krätke, J. Klose, M. Bienert, M. Beyermann: „Synthesis of Biologically Active Peptide-PNA Conjugates and Artificial Receptors by Sortase-Mediated Ligation“, 29<sup>th</sup> European Peptide Symposium, 03.-08.09.2006, Gdansk, Polen.

S. Pritz, Y. Wolf, O. Kraetke, J. Klose, M. Bienert, M. Beyermann: „Enzymatic ligation of peptides, peptide nucleic acids and proteins by means of sortase A“, 20<sup>th</sup> American Peptide Symposium, 26.-30.06.2007, Montreal, Kanada.

## **Eidesstattliche Erklärung**

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von November 2003 bis Februar 2008 am Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie in Berlin angefertigt und von Herrn Prof. Dr. M. Bienert und Herrn Dr. M. Beyermann betreut.

Ich versichere, dass ich die Arbeit selbständig und ohne unerlaubte Hilfsmittel angefertigt habe.

Berlin, im Februar 2008

Stephan Pritz